

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-289881

(P2003-289881A)

(43) 公開日 平成15年10月14日 (2003. 10. 14)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ページ数 (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		39/395	D 4 B 0 2 4
39/395		45/00	N 4 B 0 6 3
45/00		48/00	4 B 0 6 4
			4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数66 O L (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-223200 (P2002-223200)

(22) 出願日 平成14年7月31日 (2002. 7. 31)

(31) 優先権主張番号 特願2001-266510 (P2001-266510)

(32) 優先日 平成13年7月31日 (2001. 7. 31)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願2002-25878 (P2002-25878)

(32) 優先日 平成14年2月1日 (2002. 2. 1)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 501304319

国立療養所中部病院長

愛知県大府市森岡町源吾36の3

(71) 出願人 501304205

駒野 宏人

愛知県刈谷市山池町4丁目612番地

(71) 出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(74) 代理人 100092783

弁理士 小林 浩 (外5名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病関連遺伝子のスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 アミロイドβタンパクの産生を制御する遺伝子のスクリーニング方法の提供。

【解決手段】 アミロイドβタンパクの産生を制御する遺伝子、該遺伝子にコードされるタンパク質またはその塩などの提供。該遺伝子を用いたスクリーニング方法の提供。前記タンパク質に対する抗体、該抗体を含有してなる診断剤等。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アミロイドβタンパク質(Aβ)の前駆体タンパク質(βAPP)フラグメントからのAβの産生が促進されることにより選択マーカー遺伝子の発現が亢進するよう設計された細胞株に、DNAライブラリーを導入し、Aβの産生が亢進している細胞の導入DNAクローンを同定することを特徴とするAβの産生を制御するDNAのスクリーニング方法。

【請求項2】 Aβの産生を制御するDNAがヒトcDNAである請求項1記載のスクリーニング方法。

【請求項3】 Aβの産生を制御するDNAがヒト染色体DNAである請求項1記載のスクリーニング方法。

【請求項4】 該細胞株が、(1)βAPPのγ-セクレターゼ切断部位を含むβAPPフラグメントと転写促進因子との融合タンパク質をコードするDNAを含むベクターと(2)転写促進因子の転写活性により選択マーカー遺伝子の転写が惹起されるようにプロモーターの下流に選択マーカー遺伝子を結合させたDNAを含むベクターとで形質転換された形質転換体である請求項1記載のスクリーニング方法。

【請求項5】 細胞株が、(1)βAPPのγ-セクレターゼ切断部位を含むβAPPフラグメントとNotchのC端側転写因子領域との融合タンパク質(CAPP-NICD)をコードするDNAを含むベクターと(2)Notchの転写活性により薬剤耐性遺伝子の転写が惹起されるようにHES-1プロモーターの下流に薬剤耐性遺伝子を結合させたDNAを含むベクターとで形質転換された形質転換体である請求項1記載のスクリーニング方法。

【請求項6】 細胞株が融合タンパク質と選択マーカーを共発現する請求項4または5記載のスクリーニング方法。

【請求項7】 請求項1記載のスクリーニング方法により得られうるアミロイドβタンパク質(Aβ)の産生を制御するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを含有するDNA。

【請求項8】 Aβの産生を制御するDNAがヒトcDNAである請求項7記載のDNA。

【請求項9】 Aβの産生を制御するDNAがヒト染色体DNAである請求項7記載のDNA。

【請求項10】 アルツハイマー病に関連する請求項7記載のDNA。

【請求項11】 Aβの産生を亢進するDNAである請求項7記載のDNA。

【請求項12】 Aβの産生を亢進するDNAが、配列番号:4で表わされる塩基配列を含有するヒトcDNA(Genbank accession No. AAH06223)をコードするDNAである請求項11記載のDNA。

【請求項13】 Aβの産生を亢進するDNAが、配列番号:5で表わされる塩基配列を含有するヒトHerp(Genbank accession No. AB034989)をコードするDNAで

ある請求項11記載のDNA。

【請求項14】 Aβの産生を促進するDNAが、配列番号:6で表わされる塩基配列を含有するヒト5-リボキシゲナーゼ(Genbank accession no. XM 005818)の部分配列をコードするDNAである請求項11記載のDNA。

【請求項15】 Aβの産生を促進するDNAが、配列番号:21で表わされる塩基配列を含有するヒト5-リボキシゲナーゼの全長配列をコードするDNAである請求項11記載のDNA。

【請求項16】 請求項7記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項17】 請求項16記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項18】 請求項17記載の形質転換体を培養し、請求項7記載のDNAにコードされるペプチドまたはタンパク質を生成せしめることを特徴とする請求項7記載のDNAにコードされるペプチドもしくはタンパク質またはその塩の製造法。

【請求項19】 請求項7記載のDNAまたはその一部を含有してなる診断剤。

【請求項20】 アルツハイマー病の診断剤である請求項19記載の診断剤。

【請求項21】 請求項7記載のDNAを用いることを特徴とするアルツハイマー病の診断方法。

【請求項22】 請求項7記載のDNAを用いることを特徴とする請求項7記載のDNAの一塩基多型(SNP s)を検出する方法。

【請求項23】 アルツハイマー病患者の請求項7記載のDNAに相当するDNAの塩基配列を解読し、請求項7記載のDNAの塩基配列と比較することを特徴とする請求項22記載の検出方法。

【請求項24】 請求項7記載のDNAの一塩基多型(SNP s)。

【請求項25】 請求項24記載の一塩基多型(SNP s)を含有してなる診断剤。

【請求項26】 さらに請求項7記載のDNAまたはその一部を含有する請求項25記載の診断剤。

【請求項27】 アルツハイマー病の診断剤である請求項25または26記載の診断剤。

【請求項28】 請求項24記載の一塩基多型(SNP s)を用いることを特徴とするアルツハイマー病の診断方法。

【請求項29】 請求項7記載のDNAまたはその一部を用いる請求項28記載の診断方法。

【請求項30】 請求項7記載のDNAにコードされるペプチドもしくはタンパク質またはその塩。

【請求項31】 アルツハイマー病に関連する請求項30記載のペプチドもしくはタンパク質またはその塩。

【請求項32】 Aβの産生を亢進する請求項30記載

のペプチドもしくはタンパク質またはその塩。

【請求項33】 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する、A β の産生を亢進するタンパク質またはその塩。

【請求項34】 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する、A β の産生を亢進するタンパク質またはその塩。

【請求項35】 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する、A β の産生を亢進するタンパク質またはその塩。

【請求項36】 配列番号：22で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する、A β の産生を亢進するタンパク質またはその塩。

【請求項37】 請求項29～36のいずれかに記載のペプチド、タンパク質またはその塩に対する抗体。

【請求項38】 請求項29～36のいずれかに記載のペプチド、タンパク質またはその塩の活性を不活性化する中和抗体である請求項37記載の抗体。

【請求項39】 請求項37記載の抗体を含有してなる診断剤。

【請求項40】 アルツハイマー病の診断剤である請求項39記載の診断剤。

【請求項41】 請求項37記載の抗体を用いることを特徴とする請求項29～36のいずれかに記載のペプチド、タンパク質またはその塩の定量法。

【請求項42】 請求項41記載の定量法を用いるアルツハイマー病の診断方法。

【請求項43】 請求項32記載のA β の産生を亢進するペプチドもしくはタンパク質またはその塩に対する抗体を含有してなる医薬。

【請求項44】 アルツハイマー病の予防・治療剤である請求項43記載の医薬。

【請求項45】 哺乳動物に対して、請求項32記載のA β の産生を亢進するペプチドもしくはタンパク質またはその塩に対する抗体の有効量を投与することを特徴とするアルツハイマー病の予防・治療方法。

【請求項46】 請求項7記載のDNAと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスDNA。

【請求項47】 請求項46記載のアンチセンスDNAを含有してなる診断剤。

【請求項48】 アルツハイマー病の診断剤である請求項47記載の診断剤。

【請求項49】 請求項11記載のA β の産生を亢進するDNAと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスDNAを含有してなる医薬。

【請求項50】 アルツハイマー病の予防・治療剤である請求項49記載の医薬。

【請求項51】 哺乳動物に対して、請求項49記載のアンチセンスDNAの有効量を投与することを特徴とす

るアルツハイマー病の予防・治療方法。

【請求項52】 請求項7記載のDNAを用いることを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)産生阻害薬のスクリーニング方法。

【請求項53】 請求項30記載のペプチドもしくはタンパク質またはその塩を用いることを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)産生阻害薬のスクリーニング方法。

【請求項54】 請求項37記載の抗体を用いることを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)産生阻害薬のスクリーニング方法。

【請求項55】 請求項46記載のアンチセンスDNAを用いることを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)産生阻害薬のスクリーニング方法。

【請求項56】 請求項17記載の形質転換体を用いることを特徴とするアミロイド β タンパク質(A β)産生阻害薬のスクリーニング方法。

【請求項57】 請求項52～56のいずれかに記載のスクリーニング方法で得られうるアミロイド β タンパク質(A β)産生阻害薬。

【請求項58】 請求項57記載のA β 産生阻害薬を含有してなる医薬。

【請求項59】 アルツハイマー病の予防・治療剤である請求項58記載の医薬。

【請求項60】 哺乳動物に対して、請求項57記載のA β 産生阻害薬の有効量を投与することを特徴とするアルツハイマー病の予防・治療方法。

【請求項61】 (i)アミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)フラグメントからのA β の産生が促進されることにより選択マーカー遺伝子の発現が亢進するよう設計された細胞株と(ii)その細胞株に請求項11記載のA β の産生を亢進するDNAを導入した細胞株に対して、試験化合物を添加した場合における、それぞれのA β の産生量の差を測定することを特徴とするA β の産生を制御する物質のスクリーニング方法。

【請求項62】 (i)アミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)フラグメントからのA β の産生が促進されることにより選択マーカー遺伝子の発現が亢進するよう設計された細胞株と(ii)その細胞株に請求項12記載のA β の産生を亢進するDNAを導入した細胞株に対して、試験化合物を添加した場合における、それぞれの選択マーカーの生物活性の差を測定することを特徴とするA β の産生を制御する物質のスクリーニング方法。

【請求項63】 選択マーカー遺伝子が薬剤耐性遺伝子であり、選択マーカーの生物活性が薬剤耐性である請求項62記載のスクリーニング方法。

【請求項64】 請求項7記載のDNAを用いることを特徴とする当該DNAの発現抑制薬のスクリーニング方

法。

【請求項 65】 請求項 9 記載のヒト染色体 DNA のプロモーター領域とレポーター遺伝子を組み合わせ、試験化合物を添加した場合と添加しない場合における、それぞれのレポーター活性を測定することを特徴とする当該ペプチドまたはタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター活性を抑制または促進する化合物のスクリーニング方法。

【請求項 66】 請求項 30 記載のペプチドもしくはタンパク質またはその塩を発現し得る細胞に、試験化合物を添加した場合と添加しない場合における、それぞれの当該ペプチドもしくはタンパク質またはその塩あるいはそれらの DNA の発現量を抑制する化合物のスクリーニング法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、アルツハイマー病の発症・進展に深く関わっているアミロイド β タンパク ($A\beta$) の産生を制御する遺伝子を探索する方法に関する。すなわち、本発明は、 $A\beta$ 前駆体タンパク質 (β APP) フラグメントからの $A\beta$ の産生が促進されることにより薬剤耐性遺伝子の発現が亢進するよう設計された細胞株、および、その細胞株を作製するために必要な組換え DNA 構築物、さらに、該細胞株にヒト cDNA ライブラリーをトランスフェクトし、薬剤耐性能を獲得し $A\beta$ の産生が亢進している細胞の cDNA を同定することによる $A\beta$ の産生を制御する遺伝子のスクリーニング方法に関する。また、本発明は、このスクリーニング方法により見出された $A\beta$ の産生を制御する遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、これによる形質変換体、該形質変換体による組換えタンパク質製造法、該製造法による組換えタンパク質、該組換えタンパク質に対する抗体、これらの形質変換体あるいは組換えタンパク質を用いた $A\beta$ 産生阻害剤のスクリーニング方法、そのスクリーニング法より得られた $A\beta$ 産生阻害剤に関する。本発明はさらに、これらの遺伝子、その遺伝子と特異的にハイブリダイズするヌクレオチド、それらの遺伝子に由来する組換えタンパク質、その抗体あるいは $A\beta$ 産生阻害剤を含有する医薬組成物、疾病の診断方法、治療方法および予防方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 アルツハイマー病患者脳の病理学的特徴として、神経細胞の脱落に加えて、老人斑、神経原線維変化の蓄積が知られている。これらのうち、アルツハイマー病における最初期の病理変化は老人斑の形成であり、その主要構成成分が $A\beta$ であることから、 $A\beta$ の産生あるいは分解の異常がアルツハイマー病の発症・進展に深く関わっていると考えられている。 $A\beta$ は前駆体タンパク質 (β APP) から β -セクレターゼと γ -セクレターゼにより切断され産生される。 β -セクレターゼ

については、既に新規アスバラギン酸プロテアーゼであることが同定された (Neuron 27, 419-422, 2000)。一方、 γ -セクレターゼについては、家族性アルツハイマー病 (FAD) 原因遺伝子、プレセニリンあるいはプレセニリンを含む複合体がその活性発現に関与していることが明らかにされている (Neuron 27, 419-422, 2000)。また、最近、プレセニリンと複合体を形成し、 β APP のプロセッシングに関与する新規膜貫通型糖蛋白質としてニカストリン (Nicastrin) が報告された (Nature 407, 48-54, 2000)。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、 γ -セクレターゼについては、その実体の詳細は不明である (Neuron 27, 419-422, 2000)。 γ -セクレターゼ活性は抗プレセニリン抗体によって巨大な分子量のフラクションに回収され、その活性の制御には、プレセニリン N 端および C 端フラグメント複合体の安定化因子など、多くの未同定の因子が関与し得ると考えられる。さらに、 β APP のプロセッシングは、粗面小胞体、Golgi 体などから細胞膜上へ輸送される分泌経路、細胞膜上、さらに、細胞内に再取り込みされた後のエンドソーム内で引き起こされることから (Trends in Cell Biology 8, 447-453, 1998)、 β APP の細胞内輸送系に関与する様々な因子も $A\beta$ の産生に影響し得ると考えられる。そこで、これらの因子を遺伝子として同定することは、 $A\beta$ の産生を抑制する薬剤の開発やアルツハイマー病の診断薬など、新しい医薬への応用を図ることができることから、極めて重要なことと考えられる。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、 $A\beta$ の産生を制御する遺伝子を探索するため、まず、 β APP フラグメントから $A\beta$ の産生が促進されることにより薬剤耐性遺伝子の発現が亢進するよう設計された細胞株を考案した。詳しくは、第一に、 β APP の γ -セクレターゼ切断部位を含む β APP フラグメントと、Notch の C 端側転写因子領域との融合タンパク質 (CAPP-NICD) をコードする融合遺伝子を作製し、第二に、Notch の転写活性によりビュロマイシン耐性遺伝子の転写が開始されるように、HES-1 プロモーターの下流にビュロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を結合させた選択マーカー遺伝子を作製し、これら第一および第二の組換え遺伝子を共発現させた細胞株を作製した。即ち、この細胞株においては、細胞内で CAPP-NICD が γ -セクレターゼによって切断を受け、Notch 転写因子が細胞膜から遊離すると細胞がビュロマイシン耐性になるよう設計されている。実際、発明者は、この細胞で CAPP-NICD から内在性 γ -セクレターゼにより $A\beta$ が産生されること、それに依存してビュロマイシン耐性遺伝子が発現していることを確認した。従って、この細胞を用いて、 γ -セクレターゼあるいは γ -セクレターゼ活

性を促進する調節因子のcDNAを同定することは、次の4ステップで行うことができる。まず、この細胞株にヒトcDNAライブラリーをトランスフェクトし、ピューロマイシン耐性度が増したDNAを有する細胞を選択する。次に、それらの細胞が産生するA β を測定し、A β 産生を高めるcDNAを有する細胞を選択する。さらに、そのcDNAをPCR法により同定する。最後に、得られたcDNAを、APPを発現している他の細胞にトランスフェクトし、実際に、得られたcDNAがA β の産生を高めるかどうかを調べる。これらの手段により、本発明者はこれまでに γ -セクレターゼあるいは γ -セクレターゼ活性を促進する調節因子として少なくとも3種類の遺伝子を同定した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0005】即ち、本発明は、〔1〕アミロイド β タンパク質(A β)の前駆体タンパク質(β APP)フラグメントからのA β の産生が促進されることにより選択マーカー遺伝子の発現が亢進するよう設計された細胞株に、DNAライブラリーを導入し、A β の産生が亢進している細胞の導入DNAクローンを同定することと特徴とするA β の産生を制御するDNAのスクリーニング方法、〔2〕A β の産生を制御するDNAがヒトcDNAである上記〔1〕記載のスクリーニング方法、〔3〕A β の産生を制御するDNAがヒト染色体DNAである上記〔1〕記載のスクリーニング方法、〔4〕該細胞株が、〔1〕 β APPの γ -セクレターゼ切断部位を含む β APPフラグメントと転写促進因子との融合タンパク質をコードするDNAを含むベクターと〔2〕転写促進因子の転写活性により選択マーカー遺伝子の転写が惹起されるようにプロモーターの下流に選択マーカー遺伝子を結合させたDNAを含むベクターとで形質転換された形質転換体である上記〔1〕記載のスクリーニング方法、〔5〕細胞株が、〔1〕 β APPの γ -セクレターゼ切断部位を含む β APPフラグメントとNotchのC端側転写因子領域との融合タンパク質(CAPP-NICD)をコードするDNAを含むベクターと〔2〕Notchの転写活性により薬剤耐性遺伝子の転写が惹起されるようにHES-1プロモーターの下流に薬剤耐性遺伝子を結合させたDNAを含むベクターとで形質転換された形質転換体である上記〔1〕記載のスクリーニング方法、〔6〕細胞株が融合タンパク質と選択マーカーを共発現する上記〔4または5〕記載のスクリーニング方法、〔7〕上記〔1〕記載のスクリーニング方法により得られるA β の産生を制御するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを含有するDNA、

〔8〕A β の産生を制御するDNAがヒトcDNAである上記〔7〕記載のDNA、〔9〕A β の産生を制御するDNAがヒト染色体DNAである上記〔7〕記載のDNA、〔10〕アルツハイマー病に関連する上記〔7〕

記載のDNA、〔11〕A β の産生を亢進するDNAである上記〔7〕記載のDNA、〔12〕A β の産生を亢進するDNAが、配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するヒトcDNA(Genbank accession No. AAH06223)をコードするDNAである上記〔11〕記載のDNA、〔13〕A β の産生を亢進するDNAが、配列番号：5で表わされる塩基配列を含有するヒトHerp(Genbank accession No. AB034989)をコードするDNAである上記〔11〕記載のDNA、〔14〕A β の産生を促進するDNAが、配列番号：6で表わされる塩基配列を含有するヒト5-リボキシゲナーゼ(Genbank accession no. XM 005818)の部分配列をコードするDNAである上記〔11〕記載のDNA、〔15〕A β の産生を促進するDNAが、配列番号：21で表わされる塩基配列を含有するヒト5-リボキシゲナーゼの全長配列をコードするDNAである上記〔11〕記載のDNA、〔16〕上記〔7〕記載のDNAを含有する組換えベクター、〔17〕上記〔16〕記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、〔18〕上記〔17〕記載の形質転換体を培養し、上記〔7〕記載のDNAにコードされるペプチドまたはタンパク質を生成せしめることを特徴とする上記〔7〕記載のDNAにコードされるペプチドもしくはタンパク質またはその塩の製造法、〔19〕上記〔7〕記載のDNAまたはその一部を含有してなる診断剤、〔20〕アルツハイマー病の診断剤である上記〔19〕記載の診断剤、〔21〕上記〔7〕記載のDNAを用いることを特徴とするアルツハイマー病の診断方法、〔22〕上記〔7〕記載のDNAを用いることを特徴とする上記〔7〕記載のDNAの一塩基多型(SNP s)を検出する方法、〔23〕アルツハイマー病患者の上記〔7〕記載のDNAに相当するDNAの塩基配列を解読し、上記〔7〕記載のDNAの塩基配列と比較することを特徴とする上記〔22〕記載の検出方法、〔24〕上記〔7〕記載のDNAの一塩基多型(SNP s)、〔25〕上記〔24〕記載の一塩基多型(SNP s)を含有してなる診断剤、〔26〕さらに上記〔7〕記載のDNAまたはその一部を含有する上記〔25〕記載の診断剤、〔27〕アルツハイマー病の診断剤である上記〔25〕または〔26〕記載の診断剤、〔28〕上記〔24〕記載の一塩基多型(SNP s)を用いることを特徴とするアルツハイマー病の診断方法、〔29〕上記〔7〕記載のDNAまたはその一部を用いる上記〔28〕記載の診断方法、〔30〕上記〔7〕記載のDNAにコードされるペプチドもしくはタンパク質またはその塩、〔31〕アルツハイマー病に関連する上記〔30〕記載のペプチドもしくはタンパク質またはその塩、〔32〕A β の産生を亢進する上記〔30〕記載のペプチドもしくはタンパク質またはその塩、〔33〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する、A β の産生を亢進するタン

バク質またはその塩、〔34〕配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する、A β の産生を亢進するタンパク質またはその塩、〔35〕配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する、A β の産生を亢進するタンパク質またはその塩、

〔36〕配列番号：22で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する、A β の産生を亢進するタンパク質またはその塩、〔37〕上記〔29〕～〔36〕のいずれかに記載のペプチド、タンパク質またはその塩に対する抗体、〔38〕上記〔29〕～〔36〕のいずれかに記載のペプチド、タンパク質またはその塩の活性を不活性化する中和抗体である上記〔37〕記載の抗体、〔39〕上記〔37〕記載の抗体を含有してなる診断剤、〔40〕アルツハイマー病の診断剤である上記〔39〕記載の診断剤、〔41〕上記〔37〕記載の抗体を用いることを特徴とする上記〔29〕～〔36〕のいずれかに記載のペプチド、タンパク質またはその塩の定量法、〔42〕上記〔41〕記載の定量法を用いるアルツハイマー病の診断方法、〔43〕上記〔32〕記載のA β の産生を亢進するペプチドもしくはタンパク質またはその塩に対する抗体を含有してなる医薬、〔44〕アルツハイマー病の予防・治療剤である上記〔43〕記載の医薬、〔45〕哺乳動物に対して、上記〔32〕記載のA β の産生を亢進するペプチドもしくはタンパク質またはその塩に対する抗体の有効量を投与することを特徴とするアルツハイマー病の予防・治療方法、〔46〕上記〔7〕記載のDNAと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスDNA、〔47〕上記〔46〕記載のアンチセンスDNAを含有してなる診断剤、〔48〕アルツハイマー病の診断剤である上記〔47〕記載の診断剤、〔49〕上記

〔11〕記載のA β の産生を亢進するDNAと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスDNAを含有してなる医薬、〔50〕アルツハイマー病の予防・治療剤である上記〔49〕記載の医薬、〔51〕哺乳動物に対して、上記〔49〕記載のアンチセンスDNAの有効量を投与することを特徴とするアルツハイマー病の予防・治療方法、〔52〕上記〔7〕記載のDNAを用いることを特徴とするA β 産生阻害薬のスクリーニング方法、〔53〕上記〔30〕記載のペプチドもしくはタンパク質またはその塩を用いることを特徴とするA β 産生阻害薬のスクリーニング方法、〔54〕上記

〔37〕記載の抗体を用いることを特徴とするA β 産生阻害薬のスクリーニング方法、〔55〕上記〔46〕記載のアンチセンスDNAを用いることを特徴とするA β 産生阻害薬のスクリーニング方法、〔56〕上記〔17〕記載の形質転換体を用いることを特徴とするA β 産生阻害薬のスクリーニング方法、〔57〕上記〔52〕～〔56〕のいずれかに記載のスクリーニング方法で得

られうるA β 産生阻害薬、〔58〕上記〔57〕記載のA β 産生阻害薬を含有してなる医薬、〔59〕アルツハイマー病の予防・治療剤である上記〔58〕記載の医薬、〔60〕哺乳動物に対して、上記〔57〕記載のA β 産生阻害薬の有効量を投与することを特徴とするアルツハイマー病の予防・治療方法、〔61〕(i) A β の前駆体タンパク質(BAPP)フラグメントからのA β の産生が促進されることにより選択マーカー遺伝子の発現が亢進するよう設計された細胞株と(ii)その細胞株に上記〔11〕記載のA β の産生を亢進するDNAを導入した細胞株に対して、試験化合物を添加した場合における、それぞれのA β の産生量の差を測定することの特徴とするA β の産生を制御する物質のスクリーニング方法、〔62〕(i) A β の前駆体タンパク質(BAPP)フラグメントからのA β の産生が促進されることにより選択マーカー遺伝子の発現が亢進するよう設計された細胞株と(ii)その細胞株に上記〔12〕記載のA β の産生を亢進するDNAを導入した細胞株に対して、試験化合物を添加した場合における、それぞれの選択マーカーの生物活性の差を測定することの特徴とするA β の産生を制御する物質のスクリーニング方法、〔63〕選択マーカー遺伝子が薬剤耐性遺伝子であり、選択マーカーの生物活性が薬剤耐性である上記〔62〕記載のスクリーニング方法、〔64〕上記〔7〕記載のDNAを用いることを特徴とする当該DNAの発現抑制薬のスクリーニング方法、〔65〕上記〔9〕記載のヒト染色体DNAのプロモーター領域とレポーター遺伝子を組み合わせ、試験化合物を添加した場合と添加しない場合における、それぞれのレポーター活性を測定することの特徴とする当該ペプチドまたはタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター活性を抑制または促進する化合物のスクリーニング方法、〔66〕上記〔30〕記載のペプチドもしくはタンパク質またはその塩を発現し得る細胞に、試験化合物を添加した場合と添加しない場合における、それぞれの当該ペプチドもしくはタンパク質またはその塩あるいはそれらのDNAの発現量を抑制する化合物のスクリーニング法を提供する。さらに、本発明は、〔67〕上記〔32〕記載のA β の産生を亢進するペプチドもしくはタンパク質のドミナントネガティブペプチドもしくはタンパク質またはその塩、〔68〕アミノ酸配列の置換、欠失または(および)付加によりA β の産生を亢進する作用が損失または減弱している上記〔67〕記載のドミナントネガティブペプチドもしくはタンパク質またはその塩、〔69〕上記〔67〕記載のドミナントネガティブペプチドもしくはタンパク質またはその塩を含有してなる医薬、〔70〕アルツハイマー病の予防・治療剤である上記〔69〕記載の医薬、〔71〕哺乳動物に対して、上記〔67〕記載のドミナントネガティブペプチドもしくはタンパク質またはその塩の有効量を投与することを特徴とするアルツハイマー病の予防

・治療方法、〔72〕上記〔67〕記載のドミナントネガティブペプチドまたはタンパク質をコードするDNA、〔73〕上記〔72〕記載のDNAを含有してなる医薬、〔74〕アルツハイマー病の予防・治療剤である上記〔73〕記載の医薬、および〔75〕哺乳動物に対して、上記〔72〕記載のDNAの有効量を投与することを特徴とするアルツハイマー病の予防・治療方法を提供する。

〔0006〕

【発明の実施の形態】〔DNA構築物〕本発明のAβの10 産生を制御するDNAを探索する方法には、βAPPフラグメントからのAβの産生が促進されることにより選択マーカー遺伝子の発現が亢進するよう設計された細胞株が用いられる。この細胞株には2種類の組換え遺伝子構築物が導入される。まず第一の組換え遺伝子構築物は、配列番号：7で表わされるアミノ酸配列を有するβAPPのγ-セクレターゼ切断部位を含むβAPPフラグメントとある種の転写因子活性を促進するタンパク質（転写促進因子）との融合タンパク質をコードする融合20 遺伝子を含む構築物（ベクター）である。βAPPフラグメントは、該融合タンパク質を細胞膜に繋ぎとめることができ、βAPPのγ-セクレターゼ切断部位であるAβ40（配列番号：18）または（および）Aβ42（配列番号：19）を含む長さのフラグメントでγ-セクレターゼで切断されるものであればいずれの長さのものでも良いが、好ましくは配列番号：20で表わされるアミノ酸配列を有するAβ（1-52）が用いられる。また、γ-セクレターゼで切断されるものであれば、該βAPPフラグメントに1ないし複数のアミノ酸の欠失、付加あるいは置換が施されても良い。これらの置換には家族性30 アルツハイマー病（FAD）で認められるアミノ酸変異なども含まれる。該融合タンパク質に用いられる転写因子活性を促進するタンパク質（転写促進因子）としては、内在性の転写因子システムと質的にあるいは量的に区別可能であること、前記βAPPフラグメントとの融合タンパク質が細胞膜に繋ぎとめられるものであること、さらに、融合タンパク質がγ-セクレターゼで切断された際に核内に移行し転写を促進できるものであること等の条件が満たされるものであれば、どのような転写因子システムも利用することができるが、好ましくは、40 膜内で調節的限定分解を受ける転写因子システムであるSREBP、Notch、IrelまたはATF6（Cell 100, 391-396, 2000）の転写因子領域あるいは転写促進活性領域、さらに好ましくはNotchの細胞内ドメインである配列番号：10表わされるアミノ酸配列を有するC端側転写因子領域（NICD）が用いられる。

〔0007〕第二の組換え遺伝子構築物は、前記融合タンパク質に用いた転写因子が作用しうるプロモーター配列とその下流に選択マーカー遺伝子を含む構築物（ベクター）である。プロモーター配列は、目的とする転写促50

進因子選択的にプロモーター活性が発現されるものであればどのような配列でも構わないが、例えば、転写促進因子としてNICDを用いた場合、プロモーター配列としてはHES-1またはその類似配列が、転写促進因子としてIrelのRnase Lドメインを用いた場合、プロモーター配列としてはunfolded protein response element（UPRE）が、転写促進因子としてp50ATF6を用いた場合、プロモーター配列としてはER stress response element（ERSE）またはその類似配列が用いられる。前記類似配列には、一つあるいはそれ以上の挿入、置換または欠失を含んでも良い。選択マーカー遺伝子としては、前記プロモーター配列支配下に発現し、その発現を容易に検出できるものであればどのような遺伝子を用いることも可能であるが、好ましくは薬剤耐性遺伝子が用いられる（新生化学実験講座2、核酸III、3.6動物細胞発現ベクター、p84-103）。薬剤耐性遺伝子と薬剤の組み合わせとして、（1）ビュロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子とビュロマイシンとの組み合わせ、（2）アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子（APH）とG418との組み合わせ、（3）ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子（HPH）とハイグロマイシンBとの組み合わせ、（4）キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（XGPR）とマイコフェノール酸との組み合わせ、などを用いることができる。また、親株の細胞株がヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT）またはチミジンキナーゼ（TK）欠損株である場合、これらの遺伝子とHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）との組み合わせを用いることができる。さらに、選択マーカー遺伝子としては、ジヒドロ葉酸還元酵素やアンピシリン耐性遺伝子などを用いることもできる。また、前記選択マーカー遺伝子の代用として、種々のレポーター遺伝子を用いることもできる。レポーター遺伝子としては、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、β-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、成長因子、β-グルクロニダーゼ、アルカリホスファターゼ、Green fluorescent protein（GFP）およびβ-ラクタマーゼなどが好んで用いられる。これらレポーター遺伝子のベクター構築やアッセイ法は公知の技術に従うことができる（例えば、Molecular Biotechnology 13, 29-43, 1999）。これらの第一および第二の組換え遺伝子構築物を含有するベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、その他の選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを付加させても良い。

〔0008〕〔細胞株〕本発明のスクリーニング方法に用いられる細胞株は、βAPPフラグメントからのAβの産生が促進されることにより選択マーカー遺伝子の発

現が亢進する機能を有する限り、特に限定されないが、具体的には前記2種類の組換え遺伝子構築物を導入した細胞株が用いられる。前記2種類の組換え遺伝子構築物を導入する細胞株としては、DNAライブラリーを効率よくトランスフェクトできる細胞株であれば、どのような細胞株を用いても良い。該細胞株としては、内在性に β APPを発現していない細胞株であることが望ましいが、発現していても導入した β APPフラグメントが効率良く切断されるのであれば、そうした細胞株を用いることもできる。また、内在性に γ -セクレターゼ活性を有する細胞株でも、プレセニリンなどの導入で γ -セクレターゼ活性を導入した細胞株でも、検出に十分な γ -セクレターゼ活性を有するものであれば、いずれの細胞株を用いることもできる。具体的には、細胞株としては、例えば、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO、dhfr遺伝子欠損CHO、マウスL細胞、マウスAtT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞、HEK-293細胞等の動物細胞株が挙げられるが、好ましくは、マウスpro-B cell由来の細胞株、BAF/3が用いられる。

【0009】DNAライブラリーのDNAとしては、cDNA、染色体DNA、合成DNAの何れであってもよい。染色体DNAとしては、プロモーター領域、エンハンサー領域などを含むものであってもよい。また、DNAライブラリーとしては、ヒトやその他の温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）由来のものが用いられるが、なかでもヒト由来のものが好ましく用いられる。さらに、DNAライブラリーとしては、ヒトやその他の温血動物のあらゆる細胞（例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓 β 細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睪丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（例えば、MEL、M1、CTLL-2、HT-2、WEHI-3、HL-60、JOSK-1、K562、ML-1、MOLT-

3、MOLT-4、MOLT-10、CCRF-CEM、TALL-1、Jurkat、CCRT-HSB-2、KE-37、SKW-3、HUT-78、HUT-102、H9、U937、THP-1、HEL、JK-1、CMK、KO-812、MEG-01など）に由来するものであってよく、好ましくはヒト脳由来あるいはヒト脳各部位（例えば、海馬）由来のものが用いられる。これらの組織は正常由来であっても、あるいは患者（例えばアルツハイマー病）由来であっても良い。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。前記2種類の組換え遺伝子構築物を導入された細胞株へのDNAライブラリーのトランスフェクション法としては、例えば、実験医学別冊、遺伝子導入と発現・解析法（1994年）（羊土社発行）などに従うことができる。これらの方法には、物理的手段（マイクロインジェクション、エレクトロポレーション）、化学的手段（リポフェクション、リン酸カルシウム法）およびレトロウイルスなどのウイルスベクターによる方法等が含まれる。

【0010】[A β の産生を制御するDNAのスクリーニング方法] A β の産生を制御するDNAを探索するには、まず、前記2種類の組換え遺伝子構築物を導入された細胞株（以下、親株と記載する）へDNAライブラリーをトランスフェクションする。そののち、例えば、選択マーカーとして薬剤耐性遺伝子を用いた場合、対応する薬剤の濃度を高め、高濃度の薬剤存在下でも耐性となるDNAを持つ細胞を選択することによりなされる。例えばピューロマイシンを薬剤として用いる場合、あらかじめDNAライブラリーをトランスフェクションしていない状態で、親株のピューロマイシン感受性を調べ、ほとんどの親株が生存できないピューロマイシン濃度を選択する。例えば、ピューロマイシン濃度として0.1~25 μ g/ml、好ましくは1~25 μ g/ml、さらに好ましくは5~25 μ g/mlが用いられる。また、選択マーカーの代用として、前記レポーター遺伝子を用いた場合、そのアッセイ法は公知の技術に従うことができる（例えば、Molecular Biotechnology 13, 29-43, 1999）。

【0011】次に、それらの選択された細胞が産生するA β を測定し、A β 産生を亢進させるDNAを有する細胞をスクリーニングし、そのDNAをPCRなど公知の技術により同定する。A β の測定法には種々の方法が用いられるが、A β 特異的抗体を用いる免疫化学的方法を用いることが好ましい。これらの方法には、免疫沈降法、ウェスタンブロッティング、酵素免疫測定法、サンドイッチ型酵素免疫測定法あるいはそれらの組み合わせ

方法が用いられる。A β 特異的抗体としては、ポリクローナル抗体を用いても良いが、例えば、BAN50、BNT77、BS85、BA27、BC05 (Biochemistry, 34, 10272-10278, 1995) または6E10、4G8などのモノクローナル抗体を用いても良い。とりわけ、BA27およびBC05は、それぞれA β 40およびA β 42/43に選択的な抗体であるため、これらの抗体、あるいは同様な選択性を有する抗体を用いれば、A β 40の産生を亢進させる遺伝子、A β 42/43の産生を亢進させる遺伝子、あるいはA β 40およびA β 42/43いずれの産生も亢進させる遺伝子を見つけることが可能となる。さらに、分泌型APP量はA β の産生を間接的に反映すると考えられることから、分泌型APP量を免疫沈降法、ウェスタンブロッティング、酵素免疫測定法、サンドイッチ型酵素免疫測定法などの免疫化学的方法で検出しても良い。このようにして選択されたA β の産生を亢進する候補遺伝子を、 β APPを産生している他の細胞株にトランスフェクトし、A β を測定し、これらの候補遺伝子の導入により、実際にA β の産生亢進が引き起こされることを確認する。このとき同様にA β 42/43あるいは分泌型APPを指標とすることもできる。これらの確認用の細胞株には β APPを産生し、 γ -セクレターゼ活性を有している細胞株ならどのようなものも用いることができるが、例えば、IMR-32、PC12h、Neuro-2a、SK-N-SHなどの細胞株、または β APPとPS-1/2を導入したHEK-293などの細胞株が用いられる。なお、上記した本発明のスクリーニング方法において、選択マーカーとして前記のレポーター遺伝子を使用し、そのレポーター活性を指標とすることにより、A β の産生を促進または阻害する遺伝子をスクリーニングすることができ

【0012】〔スクリーニングで得られたDNAおよびその産物〕本発明のスクリーニング方法で得られるDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）は、A β の産生を制御するDNAであり、cDNA、染色体DNA、合成DNAの何れであってもよく、特にヒトcDNA、ヒト染色体DNAが好ましい。また、本発明のDNAは、本発明のスクリーニング方法で得られたDNAそのものであってもよいし、当該DNAまたはその一部をプローブまたはブラマーとして使い、遺伝子工学の常套手段を用いてクローニングしたcDNAまたは染色体DNAであってもよい。A β の産生を制御するDNAには、A β の産生を亢進するDNAなどが含まれる。本発明のスクリーニング方法で得られたDNAとして、具体的に、以下の3つの遺伝子が取得された。

(1) Genbankに登録されているヒトcDNA (accession No. AAH06223)

このcDNAは配列番号：4で表わされる塩基配列を有しており、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質Aをコードしている。このヒトcDNAは機能不明なタンパク質AをコードするマウスcDNA

としてGenbankに登録されているcDNA (accession No. AK003241) と極めて高い相同性を示した。さらに、このcDNAはニワトリからsyndecan-4と結合するタンパク質として酵母two-hybrid法によって同定されたSyndesmos (Baciu P.C., et al. J. Cell Science 113, 315, 2000; accession no. AF095446) とも高い相同性を示した。

(2) Genbankに登録されているHerp (Kokame K. et al. J. Biol. Chem. 275: 3286, 2000; accession no. AB034989)

このcDNAは配列番号：5で表わされる塩基配列を有しており、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質Bをコードしている。このcDNAにコードされるタンパク質Bは、小胞体に局在し、小胞体ストレスでその発現が誘導されるが機能の不明なタンパク質であった。

(3) Genbankに登録されている5-リボキシゲナーゼ (accession no. XM 005818) のN末端1から389個の途中配列を含むcDNA。このcDNAは配列番号：6で表わされる塩基配列を有しており、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質Cをコードしている。これらの3つのヒトcDNAを過剰発現させるとA β の産生が亢進することから、これらのcDNAはアルツハイマー病に関連するDNAであることが判明した。これらのDNAに関しては、エクソン領域のみならず、プロモーター領域およびイントロン領域も、全てアルツハイマー病との関連で重要である。

【0013】本発明のスクリーニング方法で得られたDNAにコードされるペプチド、タンパク質またはその塩は、前記したヒトまたはその他の温血動物のあらゆる細胞やあらゆる組織由来するタンパク質であってもよく、組換えタンパク質であってもよく、また合成タンパク質であってもよい。本発明のタンパク質は、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質である。実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。さらに、本発明のタンパク質は配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。実質的に同質の活性としては、A β の産生において配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：

22で表わされるタンパク質と同質の影響を与えるものであれば、他の活性は異なってもかまわない。

【0014】また、本発明のタンパク質としては、①配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども用いられる。

【0015】本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質をはじめとする本発明のタンパク質は、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラリル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。さらに、本発明のタンパク質には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保

護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

【0016】本発明のタンパク質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、前記した本発明のタンパク質の部分ペプチドと実質的に同一のアミノ酸配列であれば何れのものであってもよい。本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、例えば、前記した配列番号：1、配列番号：2または配列番号：3で表わされる構成アミノ酸配列のうち少なくとも5個以上、好ましくは20個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

【0017】また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されているもの、また、本発明の部分ペプチドは、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）のいずれであってもよい。ここで、エステルにおけるRは上記と同意義を示す。さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のタンパク質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成した Gln がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。本発明のタンパク質またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0018】前記した本発明の配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：22で表わされ

るアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のスクリーニング方法で得られたDNAにコードされるペプチド、タンパク質（以下、ペプチドも含めてタンパク質と略記する）またはその塩は、前述したヒトやその他の哺乳動物の細胞または組織から公知のペプチドまたはタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のタンパク質をコードするDNAで形質転換された形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のタンパク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。ヒトやその他の哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトやその他の哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、得られた抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせてすることにより精製単離することができる。

【0019】本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質またはそのアミド体を取得する。上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0020】保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用することが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチル

アセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

【0021】原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bu

m, Boc, Trt, Fmocなどが用いられる。

【0022】原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃~40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

【0023】原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミド体を得ることができる。タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合

しアミノ酸エステルとした後、タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることができる。

【0024】本発明のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①~⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis)、Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド (The Peptide)、Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0025】本発明のスクリーニング方法で得られたDNAにコードされるタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、以下に説明する本発明の配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドと同様に調製することができる。本発明の配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明の配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっ

ても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖 DNA、二本鎖 RNA または DNA:RNA のハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（即ち、非コード鎖）であってもよい。本発明の配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 または配列番号：22 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする DNA としては、染色体 DNA、染色体 DNA ライブラリー、前記した細胞・組織由来の cDNA、前記した細胞・組織由来の cDNA ライブラリー、合成 DNA のいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものを

用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR 法と略称する）によって増幅することもできる。具体的には、本発明の配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 または配列番号：22 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする DNA としては、例えば、それぞれ配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6 または配列番号：21 で表わされる塩基配列を含有する DNA、または配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6 または配列番号：21 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明の配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 または配列番号：22 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の A β 産生亢進活性を有するタンパク質をコードする DNA であれば何れのものでもよい。配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6 または配列番号：21 で表わされる塩基配列とハイブリダイズできる塩基配列としては、例えば、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6 または配列番号：21 で表わされる塩基配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列などが用いられる。

【0026】ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19~40 mM、好ましくは約 19~20 mM で、温度が約 50~70℃、好ましくは約 60~65℃ の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mM で温度が約 65℃ の場合が最も好ましい。本発明の配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 または配列番号

号：22 で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする DNA の塩基配列の一部、または該 DNA と相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードする DNA を包含するだけでなく、RNA をも包含する意味で用いられる。本発明の配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 または配列番号：22 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新 PCR とその応用」15(7)、1997 記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明の配列番号：1、配列番号：2 または配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質の mRNA を定量することができる。本発明に従えば、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 または配列番号：22 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化したあるいは決定された配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 または配列番号：22 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする DNA の塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 または配列番号：22 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質の遺伝子の RNA とハイブリダイズすることができ、該 RNA の合成又は機能を阻害することができるか、あるいは配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 または配列番号：22 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質関連 RNA との相互作用を介して配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 または配列番号：22 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 または配列番号：22 で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質関連 RNA の選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、及び配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 または配列番号：22 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質関連 RNA と特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内及び生体外で配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 または配列番号：22 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療又は診断に有用である。そうしたポリヌクレオチドは、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 または配列番号：22 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質遺伝子の 5' 端ヘアピンループ、5' 端 6-ベースペア・リビート、5' 端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF 翻訳終止コドン、3' 端非翻訳領域、3' 端バリンドローム領域、及び 3' 端ヘアピンループを好ましい対象領域として選択し調製

しうが、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3
または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を含有
するタンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選
択しうる。

【0027】目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に
相補的なポリヌクレオチドとの関係、あるいは、対象物
とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドと
の関係は、「アンチセンス」であるといふことができる。
アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ
-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチ
ド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プ
リン又はピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他
のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド
骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンバ
ク質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー）又は特殊
な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマー
はDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリン
グや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含
有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、
1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにD
NA：RNAハイブリッドであることができ、さらに非
修飾ポリヌクレオチド（又は非修飾オリゴヌクレオチ
ド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当
該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたも
の、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチ
ドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾の
されたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホ
ネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カル
バメートなど）を持つもの、電荷を有する結合又は硫
黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジ
チオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（ヌク
レアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗
体、シグナルペプチド、ポリーラーリジンなど）や糖
（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有し
ているもの、インターカレート化合物（例えば、アクリ
ジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物
（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性
の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有する
もの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー
型の核酸など）であつてもよい。ここで「ヌクレオシ
ド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、プリン及び
ピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその
他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。
こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジ
ン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはそ
の他の複素環を含むものであつてよい。修飾されたヌク
レオチド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修
飾されていてよく、例えば1個以上の水酸基がハロゲン
とか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエー
テル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

【0028】本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド
（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸
（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例と
しては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そ
してポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミ
ドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定さ
れるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のよ
うな方針で好ましく設計されう。すなわち、細胞内での
アンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセ
ンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス
鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし
毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなも
のにする。こうして修飾は当該分野で数多く知られてお
り、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vo
l. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Cr
ooke et al. ed., Antisense Research and Applicatio
ns, CRC Press, 1993 などに開示がある。本発明のアン
チセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、
塩基、結合を含有していて良く、リボソーム、ミクロソ
フェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療
により適用されたり、付加された形態で与えられること
ができる。こうして付加形態で用いられるものとして
は、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジ
ンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高め
たり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例え
ば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水
性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質として
は、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリ
ルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こ
うしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させる
ことができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介し
て付着させることができる。その他の基としては、核
酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャッ
プ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAseなどのヌク
レアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられ
る。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレング
リコール、テトラエチレングリコールなどのグリコール
をはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙
げられるが、それに限定されるものではない。アンチセ
ンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の
生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは配列番号：
1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：22
で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質の生体
内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核
酸は公知の各種の方法で細胞に適用できる。

【0029】本発明の部分ペプチドをコードするDNA
としては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする
塩基配列を含有するものであればいかなるものであつ
てもよい。また、染色体DNA、染色体DNAライブラリ
ー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞

・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、(1)配列番号:4、配列番号:5、配列番号:6または配列番号:21で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または(2)配列番号:4、配列番号:5、配列番号:6または配列番号:21で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明の配列番号:1、配列番号:2、配列番号:3または配列番号:22で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質のAβ産生亢進活性を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。配列番号:4、配列番号:5、配列番号:6または配列番号:21で表わされる塩基配列の部分塩基配列とハイブリダイズできる塩基配列としては、例えば、配列番号:4、配列番号:5、配列番号:6または配列番号:21で表わされる塩基配列の部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが用いられる。

【0030】本発明の配列番号:1、配列番号:2、配列番号:3または配列番号:22で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチド(以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある)を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

【0031】DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、Mutan™-G(宝酒造)、Mutan™-K(宝酒造)などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。クローン化された本発明のタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望に

より制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のタンパク質をコードするDNAを含むDNA(例えばcDNA)から目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0032】ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0033】発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子(メソトレキセート(MTX)耐性)、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp^rと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性)等が挙げられる。特に、CHO(dhfr-)細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する

場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0034】宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160 (1968)], JM103 [ヌクレック・アシズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309 (1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517 (1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459 (1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440 (1954)] などが用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチルス (*Bacillus subtilis*) M114 [ジーン, 24巻, 255 (1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87 (1984)] などが用いられる。酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036, ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

【0035】昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、ヨトウガの幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh FiveTM 細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、カイコ由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、S

f21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592 (1985)]。動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Ver o, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr-) 細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

【0036】エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110 (1972) やジーン (Gene), 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なうことができる。酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコル, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ウイルス学 (Virology), 52巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。このようにして、本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

【0037】エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら, 「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 77巻, 4505 (1980)」や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら, 「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 81巻, 5330 (1984)」が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0038】宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。以上のようにして、形質転換体の細胞膜に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

【0039】上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により本発明のタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に本発明のタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液に含まれる本発明のタンパク質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0040】かくして得られる本発明のタンパク質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が産生する本発明のタンパク質を、精製前または精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。かくして生成する本発明のタンパク質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイ、酵素活性、シグナル情報伝達活性、物質輸送活性、物質透過活性、Aβ産生亢進活性などにより測定することができる。

【0041】〔抗体〕本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合もある）に対する抗体は、本発

明のタンパク質を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

【0042】モノクローナル抗体の作製

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG (好ましくは、PEG1000～PEG6000) が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0043】モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質の抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相 (例、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの選別は、公知あるいはそれに準じる方

法に従って行なうことができるが、通常はHAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地 (和光純薬工業 (株)) またはハイブリドーマ培養用無血清培地 (SFM-101、日水製薬 (株)) などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0044】(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体 (例、DEAE) による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

【0045】〔ポリクローナル抗体の作製〕本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原 (本発明のタンパク質抗原) とキャリアータンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアータンパク質との複合体に関し、キャリアータンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンベット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ず

つ、計約3〜10回程度行なうことができる。ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0046】以下に、本発明のA β の産生を制御するDNA（本発明のDNA）、そのDNAと相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNA、そのDNAを含有する組換えベクターによる形質変換体、そのDNAがコードするタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩（本発明のタンパク質）および本発明の抗体の用途を説明する。

（1）アルツハイマー病の組織マーカー

本発明のタンパク質は、アルツハイマー病患者の脳にも発現しているため、アルツハイマー病の組織マーカーとして使用することができる。また、本発明のタンパク質に選択的に結合するペプチド、タンパク質もしくはDNAの検出または分取にも利用できる。

（2）本発明のタンパク質が関与する各種疾病の治療・予防剤

本発明のA β 産生を亢進する作用を有するタンパク質や例えば、（1）神経変性疾患（例、老年期痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、筋萎縮性脊髄側索硬化症、糖尿病性ニューロパシー等）、（2）脳血管障害（例、脳梗塞、脳出血、脳動脈硬化に伴う脳循環不全等）時、頭部外傷・脊髄損傷時、脳炎後遺症時または脳性麻痺時の神経障害、（3）記憶障害（例、老年期痴呆、健忘症等）、

（4）軽度認知障害（mild cognitive impairment (M.C.I.)）または（5）精神疾患（例、うつ病、恐慌性障害、精神分裂症等）など、好ましくはアルツハイマー病患者でその活性あるいは発現量が亢進しているものについては、そのドミナントネガティブ体は上記疾患の治療・予防剤等の医薬として使用することができる。上記ドミナントネガティブ体は、そのアミノ酸配列の一部が置換もしくは欠失したもの、そのアミノ酸配列にアミノ酸が付加したもの、または置換、欠失、付加が組み合わさったもののいずれであってもよく、A β 産生を亢進する作用が損失または減弱しているものである。このドミナントネガティブ体は、通常の遺伝子工学的手法により作製することができる。例えば、本発明のタンパク質をコードするDNAの塩基配列を公知のキット、例えば、Mutant™ -G（宝酒造）、Mutant™ -K（宝酒造）などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って変換した後、上記の本発明のタンパク質の製造法に準じて製造することができる。また、A β 産生を亢進する作用が損失または減弱し

ていることは、ドミナントネガティブ体またはそれをコードするDNAのA β 産生を亢進する作用を本発明のスクリーニング方法で確認することによって行うことができる。

【0047】（3）各種疾患に対する医薬候補化合物のスクリーニング法

本発明のA β 産生を亢進する作用を有するタンパク質の機能（活性）を阻害（抑制）する化合物またはその塩は、例えば、（1）神経変性疾患（例、老年期痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、筋萎縮性脊髄側索硬化症、糖尿病性ニューロパシー等）、（2）脳血管障害（例、脳梗塞、脳出血、脳動脈硬化に伴う脳循環不全等）時、頭部外傷・脊髄損傷時、脳炎後遺症時または脳性麻痺時の神経障害、（3）記憶障害（例、老年期痴呆、健忘症等）、（4）軽度認知障害（mild cognitive impairment (M.C.I.)）または（5）精神疾患（例、うつ病、恐慌性障害、精神分裂症等）など、好ましくはアルツハイマー病の治療・予防剤等の医薬として使用できる。したがって、本発明のタンパク質およびそのDNAは、本発明のタンパク質の機能（活性）を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。すなわち、本発明は、本発明のタンパク質、そのDNA、そのDNAと相補的に結合するアンチセンスDNA、そのDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質変換体、または本発明の抗体を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の機能（活性）を阻害する化合物（以下、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供する。また、本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質、そのDNA、そのDNAと相補的に結合するアンチセンスDNA、そのDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質変換体、または本発明の抗体を含有するものである。上記スクリーニング方法として、具体的には、次のようなものが挙げられる。

【0048】（3-1）本発明のタンパク質と組織、細胞、またはそれらの膜画分との反応を阻害する化合物のスクリーニング方法

（i）本発明のタンパク質が作用する組織、細胞またはそれらの膜画分に、本発明のタンパク質を接触させた場合と（ii）本発明のタンパク質が作用する組織、細胞またはそれらの膜画分に、本発明のタンパク質および試験化合物を接触させた場合との比較を行うことを特徴とする本発明のタンパク質と組織、細胞またはそれらの膜画分との反応性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法があげられる。上記の細胞には株細胞を用いても良いし、初代培養系を用いても良い。細胞または組織としては、ヒトやその他の温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル等）の細胞（例えば、神経細胞、内分

泌細胞、神経内分泌細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髓細胞、肝細胞、脾細胞、メサングウム細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球、樹状細胞）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞等、もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位

（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、唾液腺、末梢血、前立腺、睪丸（精巣）、卵巣、胎盤、子宮、骨、軟骨、関節、骨格筋等を用いても良い。

【0049】本発明のスクリーニング方法においては、上記した反応性としては、結合量、細胞刺激活性、組織刺激活性などを測定して比較する。結合量を測定する場合、ピアコアなどの測定機器や標識リガンドが用いられる場合もある。後者の場合、例えば、 $[^3\text{H}]$ 、

$[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ 、蛍光色素、蛍光タンパク質、ビオチン、β-ガラクトシダーゼやパーオキシダーゼなどの酵素、フラッグなどのタグと呼ばれるペプチドなどで標識された本発明のタンパク質を利用することができる。本発明の配列番号：1、配列番号：2または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質の結合量を調べる場合、それぞれ、syndecan-4、プレセニリンあるいはFLAPと呼ばれるタンパク質、あるいはそれらの類似タンパク質を含有する組織、細胞、その膜画分あるいは粗精製画分などを用いても良い。また、細胞刺激活性としては、細胞の生化学的な変化を伴うものであればどのようなものでも良いが、例えば、アラキドン酸代謝物、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} の遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞外液のpHの低下、細胞膜電位変動、 K^+ チャンネル機能、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、NFκBの活性化、小胞体 Ca^{2+} 濃度、capacitative calcium entry (CCE)、小胞体ストレス、小胞体ストレスに伴う分子シャペロンの誘導、タウのリン酸化、軸索輸送、キネシン依存性APP軸索輸送、NO産生、アポトーシス、細胞増殖活性、細胞接着活性、細胞遊走活性、該細胞が特有に産生している生理活性物質の産生などが挙げられる。組織刺激活性としては、組織の生化学あるいは生理学的な変化を伴うものであればどのようなものでも良いが、例えば、収縮や弛緩活性を上げることができる。

【0050】（3-2）本発明のタンパク質の酵素活性に対する促進剤または阻害剤のスクリーニング法

本発明のタンパク質が酵素活性を有する場合または酵素活性に何らかの関係を有する場合、その活性を指標として、本発明のタンパク質の酵素活性を促進する化合物

（以下、促進剤と略記する）または阻害する化合物（以下、阻害剤と略記する）をスクリーニングできる。例えば、本発明の配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質は5-リボキシゲナーゼのN端部分配列に相当することから、5-リボキシゲナーゼ活性の促進剤または阻害剤のスクリーニングを行うことができる。

【0051】（3-3）形質転換体を用いた、本発明のタンパク質の活性に対する促進剤または阻害剤のスクリーニング法

本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する組換えベクターによる形質転換体を用いて、導入された該DNAに起因する形質転換体の生化学的な変化を指標として、本発明のタンパク質の活性を促進する化合物（以下、促進剤と略記する）または阻害する化合物（以下、阻害剤と略記する）をスクリーニングできる。形質転換体としては、酵母や細胞が好ましく用いられるが、細胞を用いる場合、親株として、株化細胞を用いても、初代培養系を用いても、さらに、上記（3-1）記載の種々の細胞を用いても良い。上記の導入された該DNAに起因する形質転換体の生化学的な変化の指標としては、検出可能であればどのようなものも指標として用いることが可能である。例えば、該形質転換体が特有に産生している物質（例えば、Aβ）の産生を指標とすることができる。Aβの測定法には種々の方法が用いられるが、Aβ特異的抗体を用いる免疫化学的方法を用いることが好ましい。これらの方法には、免疫沈降法、ウェスタンブロッティング、酵素免疫測定法、サンドイッチ型酵素免疫測定法あるいはそれらの組み合わせ方法が用いられる。形質転換体を作製する親株としては、内在性にβAPPを発現しているものでも、あるいは外来性にβAPPあるいはそのフラグメントを導入したものでも、内在性にγ-セクレターゼ活性を有するものでも、プレセニリンなどの導入でγ-セクレターゼ活性を導入したものでも、検出に十分なAβ産生量を示すものであれば、いずれも用いることができる。導入するβAPPやプレセニリンはFAD由来の変異を有していてもかまわない。また、本発明者が作製した、βAPPフラグメントからのAβの産生が促進されることによりビューロマイシンなどの薬剤耐性遺伝子の発現が亢進するよう設計された細胞株を親株として用いた場合、Aβの測定以外にも、ビューロマイシンなどの薬剤耐性を指標として、化合物のスクリーニングを実施することができる。

【0052】導入された該DNAに起因する形質転換体が発現している物質として、Aβ以外にも例えば、分泌型APPを用いても良い。また、Aβの中でも

10

20

30

40

50

特にA β 42に注目することもできる。さらに、上記の導入された該DNAに起因する形質転換体の生化学的な変化の指標として、本発明のタンパク質と機能的に関連する物質、例えば、リガンド、基質、被輸送物質または複合体形成因子との相互作用の変化を測定しても良い。本発明の配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と複合体を形成する因子としては、それぞれ、syndecan-4、プレセニリンまたはFLAPと呼ばれるタンパク質、あるいはそれらの類似タンパク質が含まれる。さらに、上記の導入された該DNAに起因する形質転換体の生化学的な変化の指標として、例えば、アラキドン酸代謝物、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺の遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞外液のpHの低下、細胞膜電位変動、K⁺チャンネル機能、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、NF κ Bの活性化、小胞体Ca濃度、capacitative calcium entry (CCE)、小胞体ストレス、小胞体ストレスに伴う分子シャペロンの誘導、タウのリン酸化、軸索輸送、キネシン依存性AP P軸索輸送、NO産生、アポトーシス、細胞増殖活性、細胞接着活性、細胞遊走活性などを測定しても良い。

【0053】さらに、上記の形質転換体の生化学的な変化の指標として、核、小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア、エンドゾーム、ライソゾーム、あるいはそれらの膜、プロテアソーム、細胞膜へ本発明のタンパク質あるいはある特定のタンパク質の移行を測定しても良い。特定のタンパク質として、それぞれ配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と複合体を形成する因子である、syndecan-4、プレセニリンまたはFLAPと呼ばれるタンパク質、あるいはそれらの類似タンパク質が含まれる。その検出には、放射ラベルアミノ酸などを用いて代謝的にラベルを導入し、抗体を用いて免疫沈降させたり、それらのタンパク質にGFPなどの蛍光タンパク質やフラッグなどのタグを結合させたキメラタンパク質を発現させ、その蛍光やタグを指標にタンパク質の移行を測定することができる。

【0054】(3-4) 本発明のタンパク質の発現を阻害する化合物のスクリーニング法

本発明のタンパク質、そのDNA、そのDNAと相補的に結合するアンチセンスDNA、そのDNAを含有する組換えベクターによる形質変換体、または本発明の抗体は、本発明のタンパク質の発現を阻害する化合物のスクリーニング法に用いることができる。用いる材料としては、本発明のタンパク質を発現している細胞が用いられるが、組織、動物などを用いても良い。その際、株化細胞を用いても、初代培養系を用いても、さらに、上記

(3-1) 記載の種々の細胞や組織を用いても良い。上記動物には、後述するレポーター遺伝子を導入したノッ

クアウト動物も含まれる。本発明のタンパク質の発現量は抗体などを用いて免疫化学的方法などの公知の方法により測定することもできるし、本発明のタンパク質のmRNAをノザンハイブリダイゼーション法、RT-PCRやTaqMan PCR法を用いて、公知の方法により測定することもできる。さらに、本発明のタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター領域（促進プロモーター、抑制プロモーターなど）とレポーター遺伝子を組み合わせ、プロモーター活性を促進または阻害する化合物をレポーター遺伝子アッセイによりスクリーニングすることができる。その際、親株としては、株化細胞を用いても、初代培養系を用いても、さらに、上記(3-1) 記載の種々の細胞を用いても良い。レポーター遺伝子としては、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、成長因子、 β -グルクロニダーゼ、アルカリホスファターゼ、Green fluorescent protein (GFP) および β -ラクタマーゼなどが好んで用いられる。これらレポーター遺伝子のベクター構築やアッセイ法は公知の技術に従うことができる（例えばMolecular Biotechnology 13, 29-43, 1999）。

【0055】(4) 本発明の抗体を用いる診断剤

本発明の抗体を作製し、各種疾病、例えば、(1) 神経変性疾患（例、老年期痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、筋萎縮性脊髄側索硬化症、糖尿病性ニューロパシー等）、

(2) 脳血管障害（例、脳梗塞、脳出血、脳動脈硬化に伴う脳循環不全等）時、頭部外傷・脊髄損傷時、脳炎後遺症時または脳性麻痺時の神経障害、(3) 記憶障害

（例、老年期痴呆、健忘症等）、(4) 軽度認知障害（mild cognitive impairment (M.C.I.)）または

(5) 精神疾患（例、うつ病、恐慌性障害、精神分裂症等）など、好ましくはアルツハイマー病の診断に用いることができる。また、それらの抗体を用いて、本発明の

タンパク質を定量できるほか、組織染色等による検出を行うこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')₂、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。抗体はモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒトマウスキメラ抗体、ヒト抗体、遺伝子工学的に作製されたヒト抗体でも構わない。ヒト抗体は、ヒトミエロマ細胞を用いた細胞融合法やヒトイムノグロブリン遺伝子を導入されたマウスに免疫し、そのマウスの免疫担当細胞をミエロマ細胞と細胞融合することにより作製できる（K. Tomizuka et. Al. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 722-727, 2000）。遺伝子工学的に作製されたヒト抗体には、V_H領域とV_L領域を架橋した単鎖抗体も含まれる。本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、本発明のタンパク質量）に対応した抗体、抗原も

しくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられる。これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のポリペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書等を参照することができる。

【0056】例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川 栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川 栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川 栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)等を参照することができる。

【0057】(5) 本発明の抗体を含有する医薬
本発明のA β 産生を亢進する作用を有するタンパク質の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、当該タンパク質の発現過多に起因する疾患、例えば、

(1) 神経変性疾患(例、老年期痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、筋萎縮性脊髄側索硬化症、糖尿病性ニューロパシー等)、(2) 脳血管障害(例、脳梗塞、脳出血、脳動脈硬化に伴う脳循環不全等)時、頭部外傷・脊髄損傷時、脳炎後遺症時または脳性麻痺時の神経障害、(3) 記憶障害(例、老年期痴呆、健忘症等)、(4) 軽度認知障害(mild cognitive impairment (M.C.I.))または(5) 精神疾患(例、うつ病、恐慌性障害、精神分裂症等)など、好ましくはアルツハイマー病の治療・予防剤等の医薬として使用することができる。抗体はモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト-マウスキメラ抗体、ヒト抗体、遺伝子工学的に作製されたヒト抗体でも構わない。ヒト抗体は、ヒトミエロマ細胞を用いた細胞融合法やヒトイムノグロブリン遺伝子を導入されたマウスに免疫し、そのマウスの免疫担当細胞をミエロマ細胞と細胞融合することにより作製できる。遺伝子

工学的に作製されたヒト抗体には、V_H領域とV_L領域を架橋した単鎖抗体も含まれる。

【0058】(6) 本発明のタンパク質のワクチン

本発明のタンパク質、それ自身、あるいはキャリアータンパク質とともにワクチンとして免疫し、各種疾患、例えば、(1) 神経変性疾患(例、老年期痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、筋萎縮性脊髄側索硬化症、糖尿病性ニューロパシー等)、(2) 脳血管障害(例、脳梗塞、脳出血、脳動脈硬化に伴う脳循環不全等)時、頭部外傷・脊髄損傷時、脳炎後遺症時または脳性麻痺時の神経障害、(3) 記憶障害(例、老年期痴呆、健忘症等)、(4) 軽度認知障害(mild cognitive impairment (M.C.I.))または(5) 精神疾患(例、うつ病、恐慌性障害、精神分裂症等)など、好ましくはアルツハイマー病の進展抑制剤あるいは治療剤として用いることができる。キャリアータンパク質としては、生体に対して安全性が高ければどのようなキャリアータンパク質も用いることが可能であるが、例えば、破傷風毒素などが用いられる。

【0059】(7) 本発明のタンパク質に関連した遺伝子診断法

本発明のタンパク質をコードするDNA(プロモーター領域、エクソン、イントロンを含む)またはmRNAの性状に関する情報は、それらの異常(遺伝子異常)が見出された場合、例えば、(1) 神経変性疾患(例、老年期痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、筋萎縮性脊髄側索硬化症、糖尿病性ニューロパシー等)、(2) 脳血管障害(例、脳梗塞、脳出血、脳動脈硬化に伴う脳循環不全等)時、頭部外傷・脊髄損傷時、脳炎後遺症時または脳性麻痺時の神経障害、(3) 記憶障害(例、老年期痴呆、健忘症等)、(4) 軽度認知障害(mild cognitive impairment (M.C.I.))または(5) 精神疾患(例、うつ病、恐慌性障害、精神分裂症等)など、好ましくはアルツハイマー病に関連した該DNAまたは該mRNAの損傷、突然変異、発現低下、コピー数の増加、発現過多等の異常を検出することを具現化することになるので、遺伝子診断を行う際に有用である。mRNAに関してはスプライスバリエーションの発現増加や低下、或いはmRNAエディティング(C. M. Niswender et. Al. Ann. N. Y. Acad. Sci. 861, 38-48, 1998)による変異導入も考慮される。また染色体上の座位に関する情報は本発明のDNAが関与する遺伝病の研究にも利用できる。本発明のタンパク質をコードするDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(ゲノミクス(Genomics), 第5巻, 874~879頁(1989年)、ブローニングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー(Proceeding

s of the National Academy of Sciences of the United States of America), 第86巻, 2766~2770頁(1989年)、DNAマイクロアレイ(サイエンス(Science), 第270巻, 467~470頁(1995年)、或いはその他の方法(実験医学18巻14号, 1894-1906頁, 2000年)等により実施することができる。上記のいずれかの手法により該遺伝子の発現増加或いは低下、DNAの突然変異が検出された場合は、各種疾病、例えば、(1)神経変性疾患

(例、老年期痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、筋萎縮性脊髄側索硬化症、糖尿病性ニューロパシー等)、(2)脳血管障害(例、脳梗塞、脳出血、脳動脈硬化に伴う脳循環不全等)時、頭部外傷・脊髄損傷時、脳炎後遺症時または脳性麻痺時の神経障害、(3)記憶障害(例、老年期痴呆、健忘症等)、(4)軽度認知障害(mild cognitive impairment (M.C.I.))または(5)精神疾患

(例、うつ病、恐慌性障害、精神分裂症等)など、好ましくはアルツハイマー病に関して罹り易いとか、上記疾患である可能性が高い、等の診断を行うことができる。特に近年、疾患関連遺伝子を探索する上で非常に重要なツールとしてSNPs(single nucleotide polymorphisms、一塩基多型)と呼ばれる多型マーカーが登場し、疾患へのなり易さ(なり難い)を規定していたり、薬剤に対する応答性の違い・副作用の違いにも影響するものとしてにわかに注目を集めている。SNPsのタイピング法としては、その具体的な目的に応じて、直接塩基配列決定法、Invader法、Sniper法、MALDI-TOF/MS法、オリゴSNPチップ法などが挙げられる(実験医学18巻12号, 2000年)。こうした手法により見出された本発明のタンパク質をコードするDNA(プロモーター領域、エクソン、イントロンを含む)に存在するSNPsは、それ自体単独で、或いは他の遺伝子上のSNPsや本発明のDNAと併せて解析することにより、例えば、(1)神経変性疾患(例、老年期痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、筋萎縮性脊髄側索硬化症、糖尿病性ニューロパシー等)、(2)脳血管障害(例、脳梗塞、脳出血、脳動脈硬化に伴う脳循環不全等)時、頭部外傷・脊髄損傷時、脳炎後遺症時または脳性麻痺時の神経障害、(3)記憶障害(例、老年期痴呆、健忘症等)、(4)軽度認知障害(mild cognitive impairment (M.C.I.))または(5)精神疾患(例、うつ病、恐慌性障害、精神分裂症等)など、好ましくはアルツハイマー病に対する罹りやすさの判定や発症時期の予測、或いは診断に有用である。

【0060】(8)本発明のタンパク質に関連したアンチセンスDNAを含有する医薬A β 産生を亢進する本発明のDNAまたはその一部と相補的な塩基配列を含み、当該DNAに相補的に結合し、

当該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、生体内における当該DNAまたはそれにコードされるタンパク質の機能を抑制することができるので、例えば、A β 産生を亢進するタンパク質の発現過多に起因する疾患、例えば、例えば、(1)神経変性疾患(例、老年期痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、筋萎縮性脊髄側索硬化症、糖尿病性ニューロパシー等)、(2)脳血管障害(例、脳梗塞、脳出血、脳動脈硬化に伴う脳循環不全等)時、頭部外傷・脊髄損傷時、脳炎後遺症時または脳性麻痺時の神経障害、(3)記憶障害(例、老年期痴呆、健忘症等)、(4)軽度認知障害(mild cognitive impairment (M.C.I.))または(5)精神疾患

(例、うつ病、恐慌性障害、精神分裂症等)など、好ましくはアルツハイマー病の治療・予防剤として使用することができる。例えば、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートウイルスベクター等の適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って投与することができる。該アンチセンスDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のために補助剤等の生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やマイクロカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。あるいは、エアロゾル化して吸入剤として気管内に投与することもできる。さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

【0061】(9)DNA導入動物を用いたアルツハイマー病の予防・治療薬の評価法

本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードするDNA(以下、本発明の外来性DNAと略記する)またはその変異DNA(本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある)を有する非ヒト哺乳動物を用いたアルツハイマー病の予防・治療薬の評価法を提供する。すなわち、本発明は、(1)本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、(2)非ヒト哺乳動物がげっ歯動物である第(1)記載の動物、

(3)げっ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および(4)本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物

(以下、本発明のDNA導入動物と略記する)は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞等に対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階(さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前)に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン

法、DEAE-デキストラン法等により目的とするDNAを導入することによって作出することができる。また、該DNA導入方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞等に目的とする本発明の外來性DNA導入し、細胞培養、組織培養等に利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA導入動物を作出することもできる。

【0062】非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラット等が用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なげっ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統等、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統等）またはラット（例えば、Wistar, SD等）等が好ましい。哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒト等が挙げられる。本発明の外來性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から分離・抽出された本発明のDNAをいう。本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異等）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換等が生じたDNA等が用いられ、また、異常DNAも含まれる。該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNA等が用いられる。本発明の外來性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に導入するにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを導入させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス等）由来のDNAを発現させる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクター等）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA導入哺乳動物を作出することができる。

【0063】本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージ等のバクテリオファージ、モロニー白血ウイルス等のレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルス等の動

物ウイルス等が用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミド等が好ましく用いられる。上記のDNA発現調節を行うプロモーターとしては、例えば、①ウイルス

（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルス等）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス等）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンⅠⅠ、ウロブラキンⅠⅠ、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子β、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンⅠ型およびⅡ型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼβⅠサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインⅠおよびⅡA、メタロプロティナーゼⅠ組織インヒビター、MHCクラスⅠ抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミンβ-水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、タンパク質鎖延長因子1α（EF-1α）、βアクチン、αおよびβミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋αアクチン、プレプロエンケファリンA、パソプレシン等のプロモーター等が用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトタンパク質鎖延長因子1α（EF-1α）のプロモーター、ヒトおよびニワトリβアクチンプロモーター等が好適である。

【0064】上記ベクターは、DNA導入哺乳動物において目的とするmRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーター等が用いられる。その他、目的とする外來性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部等をプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。該翻訳領域は導入動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。受精

卵細胞段階における本発明の外來性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外來性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外來性DNAを保持することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外來性DNAを有する。

【0065】本発明の外來性正常DNAを導入させた非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外來性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症、や、本発明のタンパク質が関連する疾患、例えばアルツハイマー病あるいはアルツハイマー病様病態（例えば、 $A\beta$ の脳内沈着、PHF-タウ、神経細胞死など）を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA導入動物、その組織およびその細胞を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質が関連する疾患、例えばアルツハイマー病あるいはアルツハイマー病様病態（例えば、 $A\beta$ の脳内沈着、PHF-タウ、神経細胞死など）の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行うことが可能であり、さらに、アルツハイマー病の治療・予防薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

【0066】一方、本発明の外來性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の

全てに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA導入動物、その組織およびその細胞を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討や治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。本発明のタンパク質は $A\beta$ 産生に密接に関係しており、その発現亢進は $A\beta$ の産生亢進に繋がっている。一方、この事実は、正常範囲の発現量のタンパク質が、 β APPやプレセニリンを含有する γ -セクレターゼ複合体の生理的な役割にも関与している可能性を示唆するものであり、本発明のタンパク質の異常DNA転移動物、およびその組織あるいは細胞は、アルツハイマー病の治療・予防薬の検討に有用である。

【0067】また、上記2種類の本発明のDNA導入動物のその他の利用可能性として、例えば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
- ②本発明のDNA導入動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現された本発明のタンパク質組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化する本発明のタンパク質との関連性についての解析、
- ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- ④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
- ⑤本発明の変異タンパク質の単離精製およびその抗体作製等が考えられる。

さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症等を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓

器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

【0068】また、本発明のDNA導入動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシン等のタンパク質分解酵素により、遊離したDNA導入細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行うことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、Aβ産生、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べる等ができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行うために、上述の検査法および定量法等を用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA導入動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

【0069】(10) ノックアウト動物を用いたアルツハイマー病の予防・治療薬の評価法

本発明は、本発明のタンパク質をコードするDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のタンパク質をコードするDNA発現不全非ヒト哺乳動物を用いたアルツハイマー病の予防・治療薬の評価法を提供する。以下、本発明のタンパク質をコードするDNAを略して本発明のDNAと記載することがある。すなわち、本発明は、(1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、(2) 該DNAがレポーター遺伝子(例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子)を導入することにより不活性化された第(1)項記載の胚幹細胞、(3) ネオマイシン耐性である第(1)項記載の胚幹細胞、(4) 非ヒト哺乳動物がげっ歯動物である第(1)項記載の胚幹細胞、(5) げっ歯動物がマウスである第(4)項記載の胚幹細胞、(6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、(7) 該DNAがレポーター遺伝子(例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子)を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、(8) 非ヒト哺乳動物がげっ歯動物である第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、(9) げっ歯動物がマウスである第(8)項記載の非ヒト哺乳動物、および(10) 第(7)項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有す

る本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、該DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない(以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある)非ヒト哺乳動物の胚幹細胞(以下、ES細胞と略記する)をいう。非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

【0070】本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部または全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行うことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエクソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞(以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する)の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエクソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ(β-ガラクトシダーゼ遺伝子)、cat(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子)を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエクソンの機能を破壊するか、あるいはエクソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列(例えば、polyA付加シグナル等)を挿入し、完全なmRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖(以下、ターゲッティングベクターと略記する)を、例えば相同組換え法により該動物細胞の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

【0071】また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知のEvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得する等の目的で例えば、C57BL/6マウスとC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス(C57BL/6とDBA/2との

F₁)を用いて樹立したもの等も良好に用いうる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスと戻し交配(バッククロス)することでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行うことが望ましい。ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例として挙げることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁶個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行うことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

【0072】また、第二次セクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が2n=40である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF(1-10000U/ml)存在下に炭酸ガス培養器内(好ましくは、約5%炭酸ガス、約95%空気または約5%酸素、約5%炭酸ガス、約90%空気)で約37℃で培養する等の方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液(通常約0.001-0.5%トリプシン/約0.1-5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/約1mM EDTA)処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法等がとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行うが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋等の種々のタイプの細胞に分化させることが可能で

あり[M. J. EvansおよびM. H. Kaufman, ネイチャー(Nature)第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschmanら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知の方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

【0073】本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入した

トランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

【0074】このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。本発明のタンパク質のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のタンパク質のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。また、本発明のタンパク質のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明および治療法の検討に有用である。本発明のタンパク質はA β 産生に密接に関係しており、その発現亢進はA β の産生亢進に繋がっている。一方、この事実は、正常範囲の発現量の本発明のタンパク質が、 β APPやプレセニリンを含有する γ -セクレターゼ複合体の生理的な役割にも関与している可能性を示唆するものであり、本発明のタンパク質のDNA発現不全非ヒト哺乳動物、およびその組織あるいは細胞は、アルツハイマー病の治療・予防薬の検討に有用である。

【0075】(10a)本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽

出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、アルツハイマー病の改善が見られた場合、該試験化合物をアルツハイマー病に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

【0076】(10b)本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子

(lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。例えば、本発明のペプチドをコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)で置換している場合、本来、本発明のペプチドの発現する組織で、本発明のペプチドの代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド(X-gal)のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のペプチドの動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のペプチド欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドな

どで固定し、リン酸緩衝生理食塩液（PBS）で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、β-ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のペプチドの発現を阻害し、該ペプチドの機能を阻害することができるので、例えばアルツハイマー病などの予防・治療剤などの医薬として有用である。また、本発明のDNAに対する抑制プロモーターのプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のペプチドの発現を抑制し、該ペプチドの機能を抑制することができるので、例えばアルツハイマー病などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

【0077】このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。また、本発明のペプチドのプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子導入動物）を作出すれば、特異的にそのペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポータ遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のペプチドそのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

【0078】本発明のスクリーニング方法で得られた化合物またはそれから誘導される化合物（以下、本発明のスクリーニング方法で得られた化合物と略記する場合がある）は、塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例アルカリ金属）等との塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩等が用いられる。本発明のスクリーニング方法で得られた化合物、もしくはそれから誘導される化合物またはその塩を含有する医薬は、それ自体または適当な医薬組成物

として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容される担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等があげられる。かかる組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウム等が用いられる。また、例えば非経口投与に適する剤形としては、注射剤（例、皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉注射剤、腹腔内注射剤など）、外用剤（例、経鼻投与剤、経皮投与剤、軟膏剤など）、座剤（例、直腸剤、膣座剤など）、徐放剤（例、徐放性マイクロカプセルなど）、ベレット、点滴剤などが用いられる。

【0079】このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル等）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルート等により差異はあるが、例えば、アルツハイマー病の治療目的で該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.01~1000mg、好ましくは約0.1~1000mg、さらに好ましくは約1.0~200mg、より好ましくは約1.0~50mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患等によっても異なるが、例えば、アルツハイマー病の治療目的で該化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0080】本発明のタンパク質に対するドミナントネガティブ体または本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、哺乳動物（例、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル等）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルート等によっても異なるが、例えば、本発明のドミナントネガティブ体や抗体を1回量として、通常0.001~20mg/kg体重程度、好ましくは0.01~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重

程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。本発明のタンパク質に対するドミナントネガティブ体または本発明の抗体を含有する医薬は、前記のスクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。本発明のドミナントネガティブ体をコードするDNAまたは本発明のアンチセンスDNAを含有する医薬の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のアンチセンスDNAを吸入剤として気管内に局所投与する場合、一般的に成人（体重60kg）においては、一日につき該アンチセンスDNAを約0.1～100mg投与する。本発明のドミナントネガティブ体をコードするDNAまたは本発明のアンチセンスDNAを含有する医薬は、前記のスクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

【0081】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸
cDNA : 相補的デオキシリボ核酸
A : アデニン
T : チミン
G : グアニン
C : シトシン
RNA : リボ核酸
mRNA : メッセンジャーリボ核酸

Me : メチル基
Et : エチル基
Bu : ブチル基
Ph : フェニル基
TC : チアゾリジン-4(R)-カルボキサミド基
Tos : p-トルエンスルフォニル
CHO : ホルミル
Bzl : ベンジル
Cl₂-Bzl : 2,6-ジクロロベンジル
Bom : ベンジルオキシメチル
Z : ベンジルオキシカルボニル
Cl-Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル
Br-Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
Boc : t-ブトキシカルボニル
DNP : ジニトロフェニル
Trt : トリチル
Bum : t-ブトキシメチル

dATP : デオキシアデノシン三リン酸
dTTP : デオキシチミジン三リン酸
dGTP : デオキシグアノシン三リン酸
dCTP : デオキシシチジン三リン酸
ATP : アデノシン三リン酸
EDTA : エチレンジアミン四酢酸
SDS : ドデシル硫酸ナトリウム

【0082】

Gly : グリシン
Ala : アラニン
Val : バリン
Leu : ロイシン
Ile : イソロイシン
Ser : セリン
Thr : スレオニン
Cys : システイン
Met : メチオニン
Glu : グルタミン酸
Asp : アスパラギン酸
Lys : リジン
Arg : アルギニン
His : ヒスチジン
Phe : フェニルアラニン
Tyr : チロシン
Trp : トリプトファン
Pro : プロリン
Asn : アスパラギン
Gln : グルタミン
pGlu : ピログルタミン酸
Hse : ホモセリン

【0083】また、本明細書中で頻用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
HOBt	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
HOObt	: 3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1,2,3-ベンゾトリアジン
HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
DCC	: N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

【0084】本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

【配列番号：1】本発明のAβの産生を制御するタンパク質Aのアミノ酸配列を示す。

【配列番号：2】本発明のAβの産生を制御するタンパク質Bのアミノ酸配列を示す。

【配列番号：3】本発明のAβの産生を制御するタンパク質Cのアミノ酸配列を示す。

【配列番号：4】本発明のAβの産生を制御するタンパク質Aの塩基配列を示す。

【配列番号：5】本発明のAβの産生を制御するタンパク質Bの塩基配列を示す。

【配列番号：6】本発明のAβの産生を制御するタンパク質Cの塩基配列を示す。

【配列番号：7】実施例1で用いられたAβのN末端からγ-セクレターゼ切断部位を含むAPP細胞膜領域までのAPPフラグメントのN末端にメチオニンを付加したC53のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：8】実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

【配列番号：9】実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

【配列番号：10】実施例1で用いられたマウスNotch1の細胞内ドメイン(NICD)のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：11】実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

【配列番号：12】実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

【配列番号：13】実施例1で用いられたDNAオリゴマーの塩基配列を示す。

【配列番号：14】実施例1で用いられたDNAオリゴマーの塩基配列を示す。

【配列番号：15】実施例2記載のHES-1プロモーターの塩基配列を示す。

【配列番号：16】実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

【配列番号：17】実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

【配列番号：18】Aβ40のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：19】Aβ42のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：20】Aβ52のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：21】全長5-リボキシゲナーゼcDNAの塩基配列を示す。

【配列番号：22】全長5-リボキシゲナーゼのアミノ

酸配列を示す。

【配列番号：23】実施例7で用いられたPCR産物1を増幅するためのセンスプライマーの塩基配列を示す。

10 【配列番号：24】実施例7で用いられたPCR産物1を増幅するためのアンチセンスプライマーの塩基配列を示す。

【配列番号：25】実施例7で用いられたPCR産物2を増幅するためのセンスプライマーの塩基配列を示す。

【配列番号：26】実施例7で用いられたPCR産物1を増幅するためのアンチセンスプライマーの塩基配列を示す。

【0085】後述の実施例1で得られたプラスミドをpC×NC53NICDを保持する形質転換体エシェリヒア・コリ(Escherichia coli) DH5α/pC×NC53NICDは、2001年7月26日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託番号FERMBP-7676として寄託され、さらに、2001年6月19日から大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IFO 16651として寄託されている。後述の実施例2で得られたプラスミドpHESpacを保持する形質転換体エシェリヒア・コリ(Escherichia coli) DH5α/pHESpacは、2001年7月26日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託番号FERMBP-7677として寄託され、さらに、2001年6月19日から大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IFO 16652として寄託されている。

【0086】

40 【実施例】以下に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はそれらに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作は、モレキュラー・クローニング(Molecular cloning)に記載されている方法に従った。

【0087】実施例1 キメラタンパク質C53NICDをコードするDNAの作製

AβのN末端からγ-セクレターゼ切断部位を含むAPP細胞膜領域までのAPPフラグメントのN末端にメチオニンを付加したC53(配列番号：7)をコードするDNAをヒトAPP cDNA(Kang J. et al., Natur

e 32, 733-736, 1987) を鋳型にPCR法により作製した。配列番号: 8 で示したオリゴDNA (ATCTGGTACCCC ACCATGGATGCAGAAATCCGACATGAC) をセンス鎖プライマーとして、配列番号: 9 で表されるオリゴDNA (GCTTCT AGACAGCATCACCAAGGTGATGACGAT) をアンチセンス鎖プライマーとして用いた。その際、マウスNotch 1の細胞内ドメイン(NICD) (配列番号: 10) をコードするDNA断片とのキメラDNAを調製するため、5'側に、Kpn I 部位、3'側にXba I 部位を導入した。NICDをコードするDNA断片は、マウスNotch 1 cDNA (Amo FF e t al., Genomics 15, 259-264, 1993) を鋳型にPCR法により以下の方法で調製した。まず、配列番号: 11 で示したオリゴDNA (CTGTCTAGAAAGCGCCGCGCCAGCATGGC CAG) をセンス鎖プライマー、配列番号: 12 で表されるオリゴDNA (ATTGTTACCCGCGCGCCCAATG) をアンチセンス鎖プライマーとしてPCR法を行うことにより、NICDのN末端からC端側の途中までをコードする短いDNA断片(928bp)を調製した。この断片は、5'側に人工的にXba I 部位を付加しており、また、3'側にはマウスNotch 1 cDNA配列由来のNot I 部位を含んでいる。次に、これにC53をコードするDNA断片をXba I でつなげ、このキメラDNA断片を、あらかじめKpn I とNot I 部位を導入したpCxN (Niwa H et al., Gene 108:193, 1991) に、この部位で挿入した。これにより、C53およびNICD C端側の途中までをコードするキメラDNAを含むプラスミド、pCxNC53NICD Δ Cを調製した。次に、完全長のNICDをコードするDNA断片を調製するため、あらかじめクローニングしたNICDコード領域を含むマウスNotch 1 cDNA Ssp I-Hind III 断片より、Not I-Not I DNA断片を調製し、これをpCxNC53NICD Δ CのNot I 部位に挿入した。これにより、C53NICDをコードするキメラDNAが調製され、このキメラDNAを含むプラスミドをpCxNC53NICDと命名した。なお、ベクターとして用いたpCxN (Niwa H et al., Gene 108:193, 1991) は、 β -actinのプロモーター、ネオマイシン耐性遺伝子をもつプラスミドであるが、pCxNC53NICDを調製するため、pCxNのEcoRI部位に配列番号: 13 および配列番号: 14 のDNAオリゴマー (配列番号13: 5'-AATTCGGTACCCCCGGGCGGCCGCTCGAGGA-3'、配列番号14: 3'-GCCATGGGGGCCCGCGCGGAGCTCTTTAA-5') を挿入することにより、新たにKpn I とNot I 部位を導入して使用した。

【0088】実施例2 HES-1をプロモーターとするビュロマイシン耐性遺伝子 (pac: puromycin-N-acetyl-transferase gene) の作製

HES1プロモーター (配列番号: 15) (Takebayashi K., et al. J Biol Chem. 269(7):5150-6, 1994) は、マウス染色体を鋳型とし、PCR法でKpn I とHind I I I 部位を付加し増幅し調製した。次に、これを、ベクターPGV-B (東洋ビーネット株式会社より購入。TOY

OB-Net Co., LTD) のKpn I とHind I I I 部位に挿入した。このプラスミドをpGV-B-HES-1と命名した。

一方、ビュロマイシン耐性遺伝子は、pPUR (クローンテック社) より、制限酵素Hind I I I とBamH I でビュロマイシン耐性遺伝子をコードするDNA断片を切り出し調製した。このDNA断片をpGV-B-HES-1のHind I I I とBamH I 部位に挿入し、完成したプラスミドをpHESpacと命名した。

【0089】実施例3 ビュロマイシン耐性遺伝子およびC53NICDcDNA (およびヒトヒトプレセニン1 cDNA) を恒常的に発現する細胞株: A5-9細胞 (およびA5-9-PS1) の樹立

マウスpro-B細胞由来の細胞株、BaF/3細胞 (Palacios, R., et al., Cell 41:727, 1985) に上記の構築したプラスミドをエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。細胞はネオマイシンおよびビュロマイシン耐性を指標に選択した。得られた形質変換体をA5-9細胞と命名した。さらに、A5-9細胞にヒトプレセニン1 cDNAを導入した。ヒトプレセニン1 cDNAは、ヒト脳より調製したcDNAよりPCR法で調製し (Sudoh, S. et al., J. Neurochem. 71:1535, 1998)、SR α プロモーター (Takebe, Y., Mol. Cell. Biol. 8:466, 1988) とハイグロマイシン耐性遺伝子をもつベクターに挿入したのち、エレクトロポレーション法によりA5-9細胞に遺伝子導入した。細胞はハイグロマイシン耐性を指標に選択した。得られた形質変換体をA5-9-PS1細胞と命名した。

【0090】実施例4 ヒトcDNAライブラリーの作製とA5-9あるいはA5-9-PS1細胞へのトランスフェクション

ヒトcDNAライブラリーは、ヒト海馬由来のmRNA (クローンテック社) より、ギブコ社から市販されているcDNA合成キット (SuperScriptTM Choicesystem) を用いてcDNAを合成し調製した。得られたcDNAは、BstX Iアダプター (インビトロゲン社) を付け、レトロウイルスベクター、pMX (Onishi, M. et al., Exp. Hematol. 24:324, 1996) のBstXI部位に導入した。このライブラリーをパッケージング細胞 Phoenix-Eco細胞にトランスフェクトし、ヒトcDNAライブラリーを含むウイルスを産生させた (Xu X. et al., Nature Genetics. 27:23-29, 2001; Hitoshi Y. et al., Immunity. 8:461-471, 1998)。このウイルスを既に報告されている方法にしたがい (Kitamura, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 92:9146, 1995) A5-9細胞あるいはA5-9-PS1細胞 (それぞれ4X10⁶細胞数) に感染させた。感染効率は、GFPをコードするcDNAを同時に感染させて、GFPを発現している細胞の蛍光で解析した結果、ほぼ25%であった。

【0091】実施例5 A β 産生を上げる細胞の選択
上記実施例4記載の、レトロウイルスによる感染により

ヒト海馬 cDNA ライブラリーを遺伝子導入された A5-9 細胞あるいは A5-9-PS1 細胞を、高濃度のピューロマイシン (A5-9 細胞, 25 μ g/ml; A5-9-PS1 細胞, 9 μ g/ml) 存在下で培養することにより、ピューロマイシン耐性能を獲得した細胞を選択した。用いたピューロマイシン濃度は、親株である A5-9 細胞および A5-9-PS1 細胞が死滅するピューロマイシン最低濃度が、それぞれ 20 μ g/ml および 5 μ g/ml であることから決定した。次に、それらの細胞が産生する A β を、高感度ウエスタンブロッティング法 (Ida N. et al., J. Biol. Chem. 271:22908, 1996) を用いて測定した。即ち、A β の検出は、3 日間の培養 (初期細胞濃度 2×10^5 細胞/ml, 3ml 培地) で培地に分泌される A β を抗 A β モノクローナル抗体 6E10 で免疫沈降し、その沈降物を抗 A β 抗体を用いる高感度ウエスタンブロッティング法で検出した。A β 産生量の比較は、ウエスタンブロッティング法で検出される A β のバンドの強度を親株の産生する A β 量と比較して判定した。結果を表 1 に示す。PS1 を過剰発現していない A5-9 細胞では、16 クローンのピューロマイシン耐性細胞が、また、PS1 を過剰発現している A5-9-PS1 細胞では、2 回のトランスフェクションの結果、合計約 60 クローンのピューロマイシン耐性細胞が得られた。それらのうち、A5-9 細胞では 5 クローンが、A5-9-PS1 では、25 クローンが A β 40 の産生を上げていることがわかった (表 1)。

【0092】実施例 6 A β 産生を上げる cDNA の同定

上記実施例 5 で選択された A β 産生をあげるクローンから、ヒト海馬由来 cDNA をウイルスベクター、pMX の部位をプライマー (センス鎖プライマー、配列番号: 16; GGTGGACCATCCTCTAGACTG; アンチセンス鎖プライマー、配列番号: 17; GTTACTTAAGCTAGCTTGCC) として PCR 法により同定した。) PCR 法により得られた cDNA を、ベクター pcDNA3 (インビトロゲン社) につな

ぎ、APP および PS1 を過剰発現させた HEK293 細胞にヒト cDNA ライブラリーのレトロウイルスによる感染によって獲得されたピューロマイシン耐性クローン数および A β 40 産生をあげるクローン数のまとめ

親株	ピューロマイシン 濃度 (mg/ml)	生存クローン数	A β 40 の産生を 上昇させたクローン数
A5-9-PS1 ²	9	32 (5) ¹	12
A5-9-PS1 ³	9	45 (14)	13
A5-9	25	18 (2)	5

4×10^6 の細胞に対して、ヒト海馬由来の cDNA ライブラリーをレトロウイルスによるトランスフェクション法により遺伝子導入させた。

¹ () 内の数字は、対照として、cDNA ライブラリーを感染させていない場合に生存したクローン数を示している。

^{2, 3} 2 回のセレクトーション結果を示している。

胞 (Tomita S., et al., J. Biol. Chem. 273: 19304-19310, 1998; Tomita S., et al., J. Biol. Chem. 275: 13056-13060, 2000) 4×10^5 細胞にトランスフェクトした。1 日後に、新しい培地に変え、24 時間培養したのち、培地中に分泌された A β 量を、ELISA 法 (Asami-Odaka, A. et al., 34:10272, 1995) で測定した。これまでに 3 種類のヒト海馬由来 cDNA が A β 産生量を高めることを見出した (表 2)。その一つは、Genbank に登録されているヒト cDNA (accession No. A06223) と同一のものであった。以下、本発明ではこの cDNA を遺伝子 A (配列番号: 4) とし、そのコードするタンパク質をタンパク質 A (配列番号: 1) とする。遺伝子 A は機能不明なタンパク質をコードするマウス cDNA として Genbank に登録されている cDNA (accession No. AK003241) と極めて高い相同性を示した。さらに、遺伝子 A はニワトリから syndecan-4 と結合するタンパク質として酵母 two-hybrid 法によって同定された Syndesmos (Baciu P.C., et al. J. Cell Science 113, 315, 2000; accession no. AF095446) とも高い相同性を示した。他の A β 産生を制御する遺伝子として見出されたものは、小胞体に局在し、小胞体ストレスでその発現が誘導されるが機能の不明なタンパク質である Herp (Kokame K. et al. J. Biol. Chem. 275: 3286, 2000; accession no. AB034989) (cDNA: 配列番号: 5、タンパク質: 配列番号: 2) であった。さらに、他の A β 産生を制御する遺伝子として見出されたものは、5-リボキシゲナーゼ (accession no. XM 005818) の N 末端 1 から 389 個の途中配列を含む cDNA (cDNA: 配列番号: 6、タンパク質: 配列番号: 3) であった。これらの結果から、上記 3 種類の遺伝子およびその産物は、アルツハイマー病の発症あるいは進展に関与すると考えられる。

【0093】

【表 1】

全長APPからのA β 産生量の上昇が認められたcDNA

	A β 40		A β 42 cDNA	
	濃度[pM]	A β 40 産生増加率	濃度[pM]	A β 42 産生増加率
タンパク質A	378 \pm 10(232 \pm 34)	1.6	88 \pm 22(45 \pm 2)	2.0
Herp	631 \pm 20(455 \pm 26)	1.4	222 \pm 16(146 \pm 11)	1.5
5-lipoxygenase	652 \pm 27(455 \pm 26)	1.5	272 \pm 13(146 \pm 11)	1.9

()内の数字は、対照として、ベクターだけをトランスフェクトした場合に産生されたA β 量を示している。値は、2サンプルの平均値を示した。またA β 産生増加率は、対照と比べての増加率で示した。

【0095】実施例7

また、実施例6のスクリーニングによって得られた5-リボシゲナーゼの部分cDNA配列(配列番号:6)についても、全長5-リボシゲナーゼ(cDNAを配列番号:21で、アミノ酸配列を配列番号:22で示す)を実施例4記載のヒト海馬由来のcDNAライブラリーより下記のようにPCR法により調製した。すなわち、PCR産物1(EcoRI部位を付加したセンスプライマー CGGAATTCGCGCCATGCCCTCTACACG(配列番号:23);アンチセンスプライマー CCCCGCATGCCGTACACGTACACA(配列番号:24))とPCR産物2(SalI部位を付加したセンスプライマー TGTCTACGTGTACGGCATCGGG(配列番号:25);アンチセンスプライマー GCGTCGACCTGGCTGGGCGAGCTGGCCTTCCC(配列番号:26))をそれぞれヒト海馬由来のcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法により増幅した。PCRにより得られた

全長5-リボシゲナーゼcDNA発現のA β 産生におよぼす影響

cDNA	A β 40産生増加率	A β 42産生増加率
コントロール	1.0	1.0
5-リボシゲナーゼ	2.2 \pm 0.02	1.4 \pm 0.00

【0097】

【発明の効果】本発明によって、A β の産生を制御する遺伝子のスクリーニング方法が提供され、アルツハイマー病関連遺伝子あるいはアルツハイマー病関連候補遺伝子が提供される。それらの遺伝子、それらの遺伝子と特異的にハイブリダイズするヌクレオチド、それらの遺伝子を含有する組換えベクターによる形質変換体、それらのcDNAがコードするタンパク質、あるいは該タンパク質に対する抗体を用いたアルツハイマー病の診断方法、治療方法および予防方法が提供される。さらに、そ

[Sequence Listing]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> A Method For Screening A Gene Related To Alzheimer's Disease

<130> P01-0277A

<150> JP 2001-266510

二つのPCR産物をSphI部位でのライゲーションにより全長5-リボシゲナーゼcDNAを調製した。この全長5-リボシゲナーゼcDNAを用いてA β の産生への影響を解析した。この結果を表3に示した。表3においてコントロール(対照)は、ウイルスベクター(pMX:実施例4記載)だけをトランスフェクトさせた細胞を示している。不死化したマウス線維芽細胞2 \times 10⁵をヒトAPP cDNAとともに、上記cDNAをレトロウイルスによる感染により細胞内にトランスフェクトさせ(実施例4記載)、1日後に新しい培地に変え、4日間の培地中に分泌されたA β 量を、ELISA法で測定した。A β 産生増加率は、対照と比べての増加率で示した。値は、3サンプルの平均値を示した。

【0096】

【表3】

れらの遺伝子、それらの遺伝子と特異的にハイブリダイズするヌクレオチド、それらの遺伝子を含有する組換えベクターによる形質変換体、それらのcDNAがコードするタンパク質、あるいは該タンパク質に対する抗体を用いたA β 産生阻害剤のスクリーニング方法、そのスクリーニング法より得られたA β 産生阻害剤、さらにそのA β 産生阻害剤を用いたアルツハイマー病の診断方法、治療方法および予防方法が提供される。

【0098】

【配列表】

67

68

<151> 2001-07-31

<150> JP 2002-25878

<151> 2002-02-01

<160> 26

<210> 1

<211> 211

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Ser Thr Ala Ala Val Pro Glu Leu Lys Gln Ile Ser Arg Val Glu
 1 5 10 15
 Ala Met Arg Leu Gly Pro Gly Trp Ser His Ser Cys His Ala Met Leu
 20 25 30
 Tyr Ala Ala Asn Pro Gly Gln Leu Phe Gly Arg Ile Pro Met Arg Phe
 35 40 45
 Ser Val Leu Met Gln Met Arg Phe Asp Gly Leu Leu Gly Phe Pro Gly
 50 55 60
 Gly Phe Val Asp Arg Arg Phe Trp Ser Leu Glu Asp Gly Leu Asn Arg
 65 70 75 80
 Val Leu Gly Leu Gly Leu Gly Cys Leu Arg Leu Thr Glu Ala Asp Tyr
 85 90 95
 Leu Ser Ser His Leu Thr Glu Gly Pro His Arg Val Val Ala His Leu
 100 105 110
 Tyr Ala Arg Gln Leu Thr Leu Glu Gln Leu His Ala Val Glu Ile Ser
 115 120 125
 Ala Val His Ser Arg Asp His Gly Leu Glu Val Leu Gly Leu Val Arg
 130 135 140
 Val Pro Leu Tyr Thr Gln Lys Asp Arg Val Gly Gly Phe Pro Asn Phe
 145 150 155 160
 Leu Ser Asn Ala Phe Val Ser Thr Ala Lys Cys Gln Leu Leu Phe Ala
 165 170 175
 Leu Lys Val Leu Asn Met Met Pro Glu Glu Lys Leu Val Glu Ala Leu
 180 185 190
 Ala Ala Ala Thr Glu Lys Gln Lys Lys Ala Leu Glu Lys Leu Leu Pro
 195 200 205

Ala Ser Ser

210

<210> 2

<211> 391

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Met Glu Ser Glu Thr Glu Pro Glu Pro Val Thr Leu Leu Val Lys Ser
 1 5 10 15
 Pro Asn Gln Arg His Arg Asp Leu Glu Leu Ser Gly Asp Arg Gly Trp
 20 25 30
 Ser Val Gly His Leu Lys Ala His Leu Ser Arg Val Tyr Pro Glu Arg
 35 40 45
 Pro Arg Pro Glu Asp Gln Arg Leu Ile Tyr Ser Gly Lys Leu Leu Leu

69

70

50 55 60
 Asp His Gln Cys Leu Arg Asp Leu Leu Pro Lys Gln Glu Lys Arg His
 65 70 75 80
 Val Leu His Leu Val Cys Asn Val Lys Ser Pro Ser Lys Met Pro Glu
 85 90 95
 Ile Asn Ala Lys Val Ala Glu Ser Thr Glu Glu Pro Ala Gly Ser Asn
 100 105 110
 Arg Gly Gln Tyr Pro Glu Asp Ser Ser Ser Asp Gly Leu Arg Gln Arg
 115 120 125
 Glu Val Leu Arg Asn Leu Ser Ser Pro Gly Trp Glu Asn Ile Ser Arg
 130 135 140
 Pro Glu Ala Ala Gln Gln Ala Phe Gln Gly Leu Gly Pro Gly Phe Ser
 145 150 155 160
 Gly Tyr Thr Pro Tyr Gly Trp Leu Gln Leu Ser Trp Phe Gln Gln Ile
 165 170 175
 Tyr Ala Arg Gln Tyr Tyr Met Gln Tyr Leu Ala Ala Thr Ala Ala Ser
 180 185 190
 Gly Ala Phe Val Pro Pro Pro Ser Ala Gln Glu Ile Pro Val Val Ser
 195 200 205
 Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ile His Asn Gln Phe Pro Ala Glu Asn Gln
 210 215 220
 Pro Ala Asn Gln Asn Ala Ala Pro Gln Val Val Val Asn Pro Gly Ala
 225 230 235 240
 Asn Gln Asn Leu Arg Met Asn Ala Gln Gly Gly Pro Ile Val Glu Glu
 245 250 255
 Asp Asp Glu Ile Asn Arg Asp Trp Leu Asp Trp Thr Tyr Ser Ala Ala
 260 265 270
 Thr Phe Ser Val Phe Leu Ser Ile Leu Tyr Phe Tyr Ser Ser Leu Ser
 275 280 285
 Arg Phe Leu Met Val Met Gly Ala Thr Val Val Met Tyr Leu His His
 290 295 300
 Val Gly Trp Phe Pro Phe Arg Pro Arg Pro Val Gln Asn Phe Pro Asn
 305 310 315 320
 Asp Gly Pro Pro Pro Asp Val Val Asn Gln Asp Pro Asn Asn Asn Leu
 325 330 335
 Gln Glu Gly Thr Asp Pro Glu Thr Glu Asp Pro Asn His Leu Pro Pro
 340 345 350
 Asp Arg Asp Val Leu Asp Gly Glu Gln Thr Ser Pro Ser Phe Met Ser
 355 360 365
 Thr Ala Trp Leu Val Phe Lys Thr Phe Phe Ala Ser Leu Leu Pro Glu
 370 375 380
 Gly Pro Pro Ala Ile Ala Asn
 385 390
 <210> 3
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 3
 Met Pro Ser Tyr Thr Val Thr Val Ala Thr Gly Ser Gln Trp Phe Ala

71

72

1 5 10 15
 Gly Thr Asp Asp Tyr Ile Tyr Leu Ser Leu Val Gly Ser Ala Gly Cys
 20 25 30
 Ser Glu Lys His Leu Leu Asp Lys Pro Phe Tyr Asn Asp Phe Glu Arg
 35 40 45
 Gly Ala Val Asp Ser Tyr Asp Val Thr Val Asp Glu Glu Leu Gly Glu
 50 55 60
 Ile Gln Leu Val Arg Ile Glu Lys Arg Lys Tyr Trp Leu Asn Asp Asp
 65 70 75 80
 Trp Tyr Leu Lys Tyr Ile Thr Leu Lys Thr Pro His Gly Asp Tyr Ile
 85 90 95
 Glu Phe Pro Cys Tyr Arg Trp Ile Thr Gly Asp Val Glu Val Val Leu
 100 105 110
 Arg Asp Gly Arg Ala Lys Leu Ala Arg Asp Asp Gln Ile His Ile Leu
 115 120 125
 Lys Gln His Arg Arg Lys Glu Leu Glu Thr Arg Gln Lys Gln Tyr Arg
 130 135 140
 Trp Met Glu Trp Asn Pro Gly Phe Pro Leu Ser Ile Asp Ala Lys Cys
 145 150 155 160
 His Lys Asp Leu Pro Arg Asp Ile Gln Phe Asp Ser Glu Lys Gly Val
 165 170 175
 Asp Phe Val Leu Asn Tyr Ser Lys Ala Met Glu Asn Leu Phe Ile Asn
 180 185 190
 Arg Phe Met His Met Phe Gln Ser Ser Trp Asn Asp Phe Ala Asp Phe
 195 200 205
 Glu Lys Ile Phe Val Lys Ile Ser Asn Thr Ile Ser Glu Arg Val Met
 210 215 220
 Asn His Trp Gln Glu Asp Leu Met Phe Gly Tyr Gln Phe Leu Asn Gly
 225 230 235 240
 Cys Asn Pro Val Leu Ile Arg Arg Cys Thr Glu Leu Pro Glu Lys Leu
 245 250 255
 Pro Val Thr Thr Glu Met Val Glu Cys Ser Leu Glu Arg Gln Leu Ser
 260 265 270
 Leu Glu Gln Glu Val Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ile Val Asp Phe Glu
 275 280 285
 Leu Leu Asp Gly Ile Asp Ala Asn Lys Thr Asp Pro Cys Thr Leu Gln
 290 295 300
 Phe Leu Ala Ala Pro Ile Cys Leu Leu Tyr Lys Asn Leu Ala Asn Lys
 305 310 315 320
 Ile Val Pro Ile Ala Ile Gln Leu Asn Gln Ile Pro Gly Asp Glu Asn
 325 330 335
 Pro Ile Phe Leu Pro Ser Asp Ala Lys Tyr Asp Trp Leu Leu Ala Lys
 340 345 350
 Ile Trp Val Arg Ser Ser Asp Phe His Val His Gln Thr Ile Thr His
 355 360 365
 Leu Leu Arg Thr His Leu Val Ser Glu Val Phe Gly Ile Ala Met Tyr
 370 375 380
 Arg Gln Leu Pro Ala
 <210> 4
 <211> 633

73

74

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

```

atgtcgacgg cggcgggttcc ggagctgaag cagatcagcc gggtggaggc gatgcgccta 60
gggccgggct ggagccactc gtgccacgcc atgctgtacg ccgccaaccc tgggcagctc 120
ttcggccgca tccccatgcg ctctcggtg ctgatgcaga tgcgtttcga cgggctgctg 180
ggcttccccg ggggcttcgt ggaccggcgc ttctggtcgc tggaggacgg cctgaaccgg 240
gtgctgggccc tgggcctggg ctgctgcgc ctcaccgagg ccgactacct gagctcgcac 300
ctgaccgagg gcccacaccg cgtcgtggcg cacctgtacg cgcggcagct gacgctggag 360
cagctgcacg ccgtggagat cagcgcggtg cactcgcgcg accacggcct ggagggtgctg 420
ggcctcgtgc gggtcccgt gtacacccag aaggaccgag tcggaggctt ccccaacttc 480
ctgagcaacg ctttcgtgag caggcctaag tgccagctcc tctttgccct caaggtgctc 540
aacatgatgc ccgaggagaa gctggttgag gccctggctg cagccaccga gaagcagaag 600
aaggccctgg agaagttgct cccggcctcc tct 633

```

<210> 5

<211> 1173

<212> DNA

<213> Human

<400> 5

```

atggagtccg agaccgaacc cgagcccgtc acgctcctgg tgaagagccc caaccagcgc 60
caccgcgact tggagctgag tggcgaccgc ggctggagtg tgggccacct caaggcccac 120
ctgagccgcg tctaccccga gcgtccgct ccagaggacc agaggttaat ttattctggg 180
aagctgttgt tggatcacca atgtctcagg gacttgcttc caaagcagga aaaacggcat 240
gttttgcatc tgggtgtcaa tgtgaagagt ccttcaaaaa tgccagaaat caacgccaag 300
gtggctgaat ccacagaagg gcctgctggg tctaatacggg gacagtatcc tgaaggattcc 360
tcaagtgatg gttaaggca aagggaagtt ctccggaacc ttcttcccc tggatgggaa 420
aacatctcaa ggctgaagc tgcccagcag gcattccaag gcctgggtcc tggtttctcc 480
ggttacacac cctatgggtg gcttcagctt tcctgggtcc agcagatata tgcacgacag 540
tactacatgc aatatctagc agccactgct gcatcagggg cttttgttcc accaccaagt 600
gcacaagaga tacctgtggt ctctgcacct gctccagccc ctattcacaa ccagtttcca 660
gtgaaaacc agcctgcaa tcagaatgct gctcctcaag tggttgttaa tcctggagcc 720
aatcaaaatt tgcggatgaa tgcacaagggt ggccctattg tggagaaga tgatgaaata 780
aatcgagatt ggttggattg gacctattca gcagctacat ttctgtttt tctcagtatc 840
ctctacttct actcctccct gaggagattc ctcatggta tggggggccac cgttgttatg 900
tacctgcacg acgttgggtg gtttccattt agaccgaggc cggttcagaa ctccccaaat 960
gatggctctc ctctgacgt tgaatcag gacccaaca ataacttaca ggaaggcact 1020
gatcctgaaa ctgaagaccc caaccacctc cctccagaca gggatgtact agatggcgag 1080
cagaccagcc cctcctttat gaggacagca tggcttgtct tcaagacttt ctttgcctct 1140
cttcttccag aaggccccc agccatcgca aac 1173

```

<210> 6

<211> 1167

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

```

atgccctcct acacggtcac cgtggccact ggagccaggt ggctcgcgg cactgacgac 60
tacatctacc tcagcctcgt gggctcggcg ggctgcagcg agaagcacct gctggacaag 120
cccttctaca acgacttcga gcgtggcgcg gtggattcat acgacgtgac tgtggacgag 180
gaactgggcg agatccagct ggtcagaatc gagaagcgca agtactggct gaatgacgac 240
tggtagctga agtacatcac gctgaagacg cccacgggg actacatcga gttcccctgc 300
taccgctgga tcaccggcga tgcgagggt gtctgaggg atggacgcgc aaagtggcc 360

```

75

76

cgagatgacc aaattcacat tctcaagcaa caccgacgta aagaactgga aacacggcaa 420
 aaacaatatc gatggatgga gtggaaccct ggcttcccct tgagcatcga tgccaaatgc 480
 cacaaggatt taccccgtag tatccagttt gatagtgaag aaggagtgga ctttgttctg 540
 aattactcca aagcgatgga gaacctgttc atcaaccgct tcatgcacat gtccagtcct 600
 tcttggaatg acttcgccga ctttgagaaa atctttgtca agatcagcaa cactatttct 660
 gagcgggtca tgaatcactg gcaggaagac ctgatgtttg gctaccagtt cctgaatggc 720
 tgcaaccctg tgttgatccg gcgctgcaca gagctgcccg agaagctccc ggtgaccacg 780
 gagatggtag agtgagcctt ggagcggcag ctgagcttgg agcaggaggt ccagcaaggg 840
 aacattttca tcgtggactt tgagctgctg gatggcatcg atgccaacaa aacagacccc 900
 tgcacactcc agttcctggc cgctcccatc tgcttgctgt ataagaacct ggccaacaag 960
 attgtcccca ttgccatcca gctcaaccaa atcccgggag atgagaacct tattttcctc 1020
 ctttcggatg caaaatacga ctggcttttg gccaaaatct ggggtgcgttc cagtgaacttc 1080
 cacgtccacc agaccatcac ccaccttctg cgaacacatc tgggtgtctga ggtttttggc 1140
 attgcaatgt accgccagct gcctgct 1167

<210> 7

<211> 53

<212> PRT

<213> Human

<400> 7

Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln
 1 5 10 15
 Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile
 20 25 30
 Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile
 35 40 45

Thr Leu Val Met Leu

50

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

atctggtacc ccaccatgga tgcagaattc cgacatgac 39

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 9

gcttctagac agcatcacca aggtgatgac gat 33

<210> 10

<211> 786

<212> PRT

<213> Human

<400> 10

Leu Ser Arg Lys Arg Arg Arg Gln His Gly Gln Leu Trp Phe Pro Glu
 1 5 10 15

Gly Phe Lys Val Ser Glu Ala Ser Lys Lys Lys Arg Arg Glu Pro Leu
 20 25 30
 Gly Glu Asp Ser Val Gly Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ala Ser Asp Gly
 35 40 45
 Ala Leu Met Asp Asp Asn Gln Asn Glu Trp Gly Asp Glu Asp Leu Glu
 50 55 60
 Thr Lys Lys Phe Arg Phe Glu Glu Pro Val Val Leu Pro Asp Leu Ser
 65 70 75 80
 Asp Gln Thr Asp His Arg Gln Trp Thr Gln Gln His Leu Asp Ala Ala
 85 90 95
 Asp Leu Arg Met Ser Ala Met Ala Pro Thr Pro Pro Gln Gly Glu Val
 100 105 110
 Asp Ala Asp Cys Met Asp Val Asn Val Arg Gly Pro Asp Gly Phe Thr
 115 120 125
 Pro Leu Met Ile Ala Ser Cys Ser Gly Gly Gly Leu Glu Thr Gly Asn
 130 135 140
 Ser Glu Glu Glu Glu Asp Ala Pro Ala Val Ile Ser Asp Phe Ile Tyr
 145 150 155 160
 Gln Gly Ala Ser Leu His Asn Gln Thr Asp Arg Thr Gly Glu Thr Ala
 165 170 175
 Leu His Leu Ala Ala Arg Tyr Ser Arg Ser Asp Arg Arg Lys Arg Leu
 180 185 190
 Glu Ala Ser Ala Asp Ala Asn Ile Gln Asp Asn Met Gly Arg Thr Pro
 195 200 205
 Leu His Ala Ala Val Ser Ala Asp Ala Gln Gly Val Phe Gln Ile Leu
 210 215 220
 Leu Arg Asn Arg Ala Thr Asp Leu Asp Ala Arg Met His Asp Gly Thr
 225 230 235 240
 Thr Pro Leu Ile Leu Ala Ala Arg Leu Ala Val Glu Gly Met Leu Glu
 245 250 255
 Asp Leu Ile Asn Ser His Ala Asp Val Asn Ala Val Asp Asp Leu Gly
 260 265 270
 Lys Ser Ala Leu His Trp Ala Ala Ala Val Asn Asn Val Asp Ala Ala
 275 280 285
 Val Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asn Lys Asp Ile Glu Asn Asn Lys
 290 295 300
 Glu Glu Thr Ser Leu Phe Leu Ser Ile Arg Arg Glu Ser Tyr Glu Thr
 305 310 315 320
 Ala Lys Val Leu Leu Asp His Phe Ala Asn Arg Asp Ile Thr Asp His
 325 330 335
 Met Asp Arg Leu Pro Arg Asp Ile Ala Gln Glu Arg Met His His Asp
 340 345 350
 Ile Val Arg Leu Leu Asp Glu Tyr Asn Leu Val Arg Ser Pro Gln Leu
 355 360 365
 His Gly Thr Ala Leu Gly Gly Thr Pro Thr Leu Ser Pro Thr Leu Cys
 370 375 380
 Ser Pro Asn Gly Tyr Pro Gly Asn Leu Lys Ser Ala Thr Gln Gly Lys
 385 390 395 400
 Lys Ala Arg Lys Pro Ser Thr Lys Gly Leu Ala Cys Gly Ser Lys Glu
 405 410 415

Ala Lys Asp Leu Lys Ala Arg Arg Lys Ser Ser Gln Asp Gly Lys Gly
 420 425 430
 Trp Leu Leu Asp Ser Ser Ser Ser Met Leu Ser Pro Val Asp Ser Leu
 435 440 445
 Glu Ser Pro His Gly Tyr Leu Ser Asp Val Ala Ser His Pro Leu Leu
 450 455 460
 Pro Ser Pro Phe Gln Gln Ser Pro Ser Met Pro Leu Ser His Leu Pro
 465 470 475 480
 Gly Met Pro Asp Thr His Leu Gly Ile Ser His Leu Asn Val Ala Ala
 485 490 495
 Lys Pro Glu Met Ala Ala Leu Ala Gly Gly Ser Arg Leu Ala Phe Glu
 500 505 510
 His Pro Pro Pro Arg Leu Ser His Leu Pro Val Ala Ser Ser Ala Cys
 515 520 525
 Thr Val Leu Ser Thr Asn Gly Thr Gly Ala Met Asn Phe Thr Val Gly
 530 535 540
 Ala Pro Ala Ser Leu Asn Gly Gln Cys Glu Trp Leu Pro Arg Leu Gln
 545 550 555 560
 Asn Gly Met Val Pro Ser Gln Tyr Asn Pro Leu Arg Pro Gly Val Thr
 565 570 575
 Pro Gly Thr Leu Ser Thr Gln Ala Ala Gly Leu Gln His Ser Met Met
 580 585 590
 Gly Pro Leu His Ser Ser Leu Ser Thr Asn Thr Leu Ser Pro Ile Ile
 595 600 605
 Tyr Gln Gly Leu Pro Asn Thr Arg Leu Ala Thr Gln Pro His Leu Val
 610 615 620
 Gln Thr Gln Gln Val Gln Pro Gln Asn Leu Pro Leu Gln Pro Gln Asn
 625 630 635 640
 Leu Gln Pro Pro Ser Gln Pro His Leu Ser Val Ser Ser Ala Ala Asn
 645 650 655
 Gly His Leu Gly Arg Ser Phe Leu Ser Gly Glu Pro Ser Gln Ala Asp
 660 665 670
 Val Gln Pro Leu Gly Pro Ser Ser Leu Pro Val His Thr Ile Leu Pro
 675 680 685
 Gln Glu Ser Gln Ala Leu Pro Thr Ser Leu Pro Ser Ser Met Val Pro
 690 695 700
 Pro Met Thr Thr Thr Gln Phe Leu Thr Pro Pro Ser Gln His Ser Tyr
 705 710 715 720
 Ser Ser Ser Pro Val Asp Asn Thr Pro Ser His Gln Leu Gln Val Pro
 725 730 735
 Glu Pro Thr Phe Leu Thr Pro Ser Pro Glu Ser Pro Asp Gln Trp Ser
 740 745 750
 Ser Ser Ser Pro His Ser Asn Ile Ser Asp Trp Ser Glu Gly Ile Ser
 755 760 765
 Ser Pro Pro Thr Thr Met Pro Ser Gln Ile Thr His Ile Pro Glu Ala
 770 775 780
 Phe Lys
 785
 <210> 11
 <211> 33

81

82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 11

ctgtctagaa agcgccggcg ccagcatggc cag

33

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 12

attgttcacc gcggccgccc aatg

24

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 13

aattcggtac ccccgggcg gccgcctcga gga

33

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 14

gccatggggg ccccgccggc ggagctcctt taa

33

<210> 15

<211> 354

<212> DNA

<213> Human

<400> 15

ctcaggcgcg cgccattggc cgccagacct tgtgcctagc ggccaatggg ggggcgcagt

60

ccacgagcgg tgccgcgtgt ctcttctcc cattggctga aagttactgt gggaaagaaa

120

gtttgggaag ttccacacga gccgttcgcg tgcagtccca gatatatata gaggccgcca

180

gggcctgcgg atcacacagg atctggagct ggtgctgata acagcggaat cccctgtcta

240

cctctctcct tggctctgga atagtgtac cgatcactaa gtagccctaa gacataataa

300

accttcaact gctcagtagt ttttctatg aaagtcaagt aaaaggacgt aagc

354

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 16

ggtaggaccat cctctagact g

21

<210> 17

83

84

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 17

gttacttaag ctagcttgcc

20

<210> 18

<211> 40

<212> PRT

<213> Human

<400> 18

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1

5

10

15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20

25

30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val

35

40

<210> 19

<211> 42

<212> PRT

<213> Human

<400> 19

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1

5

10

15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20

25

30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35

40

<210> 20

<211> 52

<212> PRT

<213> Human

<400> 20

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1

5

10

15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20

25

30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr

35

40

45

Leu Val Met Leu

50

<210> 21

<211> 2076

<212> DNA

<213> Human

<400> 21

cgcgccatgc cctcctacac ggtcaccgtg gccactggca gccagtgggt cgccggcact

60

gacgactaca tctacctcag cctcgtgggc tcggcgggct gcagcgagaa gcacctgctg 120
 gacaagccct tctacaacga cttcagcgt ggccgggtgg attcatacga cgtgactgtg 180
 gacgagggaac tgggcgagat ccagctggtc agaatcgaga agcgaagta ctggctgaat 240
 gacgactggg acctgaagta catcacgtg aagacgcccc acggggacta catcgagttc 300
 ccctgctacc gctggatcac cggcgatgtc gaggttgtcc tgagggatgg acgcgcaaag 360
 ttggcccag atgaccaaatt tcacattctc aagcaacacc gacgtaaaga actggaaaca 420
 cggcaaaaac aatatcgatg gatggagtgg aacctggct tccccctgag catcgatgcc 480
 aaatgccaca aggatttacc ccgtgatatc cagtttgata gtgaaaaagg agtggacttt 540
 gttctgaatt actccaagc gatggagaac ctgttcatca accgcttcat gcacatgttc 600
 cagcttctt ggaatgactt cggcgacttt gagaaaaatc ttgtcaagat cagcaaacct 660
 atttctgagc gggtcattgaa tcactggcag gaagacctga tgtttggcta ccagttcctg 720
 aatggctgca accctgtgtt gatccggcgc tgcacagagc tgcccagagaa gctcccgggtg 780
 accacggaga tggtagagtg cagcctggag cggcagctca gcttggagca ggaggtccag 840
 caagggaaca ttttcatcgt ggactttgag ctgctggatg gcatcgatgc caacaaaaca 900
 gacccttga cactccagtt cctggccgct cccatctgct tgctgtataa gaacctggcc 960
 aacaagattg tccccattgc catccagctc aaccaaatcc cgggagatga gaacctatt 1020
 ttcttccctt cggatgcaaa atacgactgg cttttggcca aaatctgggt gcgttccagt 1080
 gacttccacg tccaccagac catcaccac cttctgcgaa cacatctggt gcttgaggtt 1140
 tttggcattg caatgtaccg ccagctgcct gctgtgcacc ccattttcaa gctgctggtg 1200
 gcacacgtga gattcaccat tgcaatcaac accaaggccc gtgagcagct catctgcgag 1260
 tgtggcctt ttgacaaggc caacgccaca gggggcgggtg ggcacgtgca gatggtgcag 1320
 agggccatga aggacctgac ctatgcctcc ctgtgctttc ccgaggccat caaggcccgg 1380
 ggcatggaga gcaaagaaga catcccctac tacttctacc gggacgacgg gctcctggtg 1440
 tgggaagcca tcaggacgtt cagggccgag gtggtagaca tctactacga gggcgaccag 1500
 gtggtggagg aggacccgga gctgcaggac ttcgtgaacg atgtctacgt gtacggcatg 1560
 cggggccgca agtcctcagg cttccccaag tcggtaaga gccgggagca gctgtcggag 1620
 tacctgaccg tggatgactt caccgctcc gccagcacg ccgcggtcaa cttcgccag 1680
 tacgactggt gctcctggat cccaatgcg ccccaacca tgcgagcccc gccaccgact 1740
 gccaaggggc tggtgaccat tgagcagatc gtggacacgc tgcccagaccg cgccgctcc 1800
 tgctggcatc tgggtgcagt gtgggcgctg agccagttcc aggaacacga gctgttctctg 1860
 ggcatgtacc cagaagagca tttatcgag aagcctgtga aggaagccat ggcccgatc 1920
 cgaagaacc tcgaggccat tgcagcgtg attgctgagc gcaacaagaa gaagcagctg 1980
 ccatattact actgttcccc agaccggatt ccgaacagtg tggccatctg agcacactgc 2040
 cagttctact gtgggaaggc cagctgcccc agccag 2076

<210> 22

<211> 673

<212> PRT

<213> Human

<400> 22

Met Pro Ser Tyr Thr Val Thr Val Ala thr Gly Ser Gln Trp Phe Ala
 1 5 10 15
 Gly Thr Asp Asp Tyr Ile Tyr Leu Ser Leu Val Gly Ser Ala Gly Cys
 20 25 30
 Ser Glu Lys His Leu Leu Asp Lys Pro Phe Tyr Asn Asp Phe Glu Arg
 35 40 45
 Gly Ala Val Asp Ser Tyr Asp Val Thr Val Asp Glu Leu Gly Glu
 50 55 60
 Ile Gln Leu Val Arg Ile Glu Lys Arg Lys Tyr Trp Leu Asn Asp Asp
 65 70 75 80

Trp Tyr Leu Lys Tyr Ile Thr Leu Lys Thr Pro His Gly Asp Tyr Ile
 85 90 95
 Glu Phe Pro Cys Tyr Arg Trp Ile Thr Gly Asp Val Glu Val Val Leu
 100 105 110
 Arg Asp Gly Arg Ala Lys Leu Ala Arg Asp Asp Gln Ile His Ile Leu
 115 120 125
 Lys Gln His Arg Arg Lys Glu Leu Glu thr Arg Gln Lys Gln Tyr Arg
 130 135 140
 Trp Met Glu Trp Asn Pro Gly Phe Pro Leu Ser Ile Asp Ala Lys Cys
 145 150 155 160
 His Lys Asp Leu Pro Arg Asp Ile Gln Phe Asp Ser Glu Lys Gly Val
 165 170 175
 Asp Phe Val Leu Asn Tyr Ser Lys Ala Met Glu Asn Leu Phe Ile Asn
 180 185 190
 Arg Phe Met His Met Phe Gln Ser Ser trp Asn Asp Phe Ala Asp Phe
 195 200 205
 Glu Lys Ile Phe Val Lys Ile Ser Asn Thr Ile Ser Glu Arg Val Met
 210 215 220
 Asn His trp Gln Glu Asp Leu Met Phe Gly Tyr Gln Phe Leu Asn Gly
 225 230 235
 Cys Asn Pro Val Leu Ile Arg Arg Cys Thr Glu Leu Pro Glu Lys Leu
 240 245 250
 Pro Val Thr Thr Glu Met Val Glu Cys Ser Leu Glu Arg Gln Leu Ser
 255 260 265 270
 Leu Glu Gln Glu Val Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ile Val Asp Phe Glu
 275 280 285
 Leu Leu Asp Gly Ile Asp Ala Asn Lys Thr Asp Pro Cys Thr Leu Gln
 290 295 300
 Phe Leu Ala Ala Pro Ile Cys Leu Leu Tyr Lys Asn Leu Ala Asn Lys
 305 310 315
 Ile Val Pro Ile Ala Ile Gln Leu Asn Gln Ile Pro Gly Asp Glu Asn
 320 325 330
 Pro Ile Phe Leu Pro Ser Asp Ala Lys Tyr Asp trp Leu Leu Ala Lys
 335 340 345 350
 Ile trp Val Arg Ser Ser Asp Phe His Val His Gln Thr Ile Thr His
 355 360 365
 Leu Leu Arg Thr His Leu Val Ser Glu Val Phe Gly Ile Ala Met Tyr
 370 375 380
 Arg Gln Leu Pro Ala Val His Pro Ile Phe Lys Leu Leu Val Ala His
 385 390 395
 Val Arg Phe Thr Ile Ala Ile Asn Thr Lys Ala Arg Glu Gln Leu Ile
 400 405 410
 Cys Glu Cys Gly Leu Phe Asp Lys Ala Asn Ala Thr Gly Gly Gly Gly
 415 420 425 430
 His Val Gln Met Val Gln Arg Ala Met Lys Asp Leu Thr Tyr Ala Ser
 435 440 445
 Leu Cys Phe Pro Glu Ala Ile Lys Ala Arg Gly Met Glu Ser Lys Glu
 450 455 460
 Asp Ile Pro Tyr Tyr Phe Tyr Arg Asp Asp Gly Leu Leu Val Trp Glu
 465 470 475

89

90

Ala Ile Arg Thr Phe Thr Ala Glu Val Val Asp Ile Tyr Tyr Glu Gly
 480 485 490
 Asp Gln Val Val Glu Glu Asp Pro Glu Leu Gln Asp Phe Val Asn Asp
 495 500 505 510
 Val Tyr Val Tyr Gly Met Arg Gly Arg Lys Ser Ser Gly Phe Pro Lys
 515 520 525
 Ser Val Lys Ser Arg Glu Gln Leu Ser Glu Tyr Leu Thr Val Val Ile
 530 535 540
 Phe Thr Ala Ser Ala Gln His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Asp
 545 550 555
 Trp Cys Ser Trp Ile Pro Asn Ala Pro Pro Thr Met Arg Ala Pro Pro
 560 565 570
 Pro Thr Ala Lys Gly Val Val Thr Ile Glu Gln Ile Val Asp Thr Leu
 575 580 585 590
 Pro Asp Arg Gly Arg Ser Cys Trp His Leu Gly Ala Val Trp Ala Leu
 595 600 605
 Ser Gln Phe Gln Glu Asn Glu Leu Phe Leu Gly Met Tyr Pro Glu Glu
 610 615 620
 His Phe Ile Glu Lys Pro Val Lys Glu Ala Met Ala Arg Phe Arg Lys
 625 630 635
 Asn Leu Glu Ala Ile Val Ser Val Ile Ala Glu Arg Asn Lys Lys Lys
 640 645 650
 Gln Leu Pro Tyr Tyr Tyr Leu Ser Pro Asp Arg Ile Pro Asn Ser Val
 655 660 665 670
 Ala Ile
 673

<210> 23

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 23

cggaattccg cgccatgccc tcctacacg

29

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 24

ccccgcatgc cgtacacgta gaca

24

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 25

tgtctacgtg tacggcatgc gggg

24

91

92

<210> 26
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223>
 <400> 26

gcgtcgacct ggctggggca gctggccttc cc

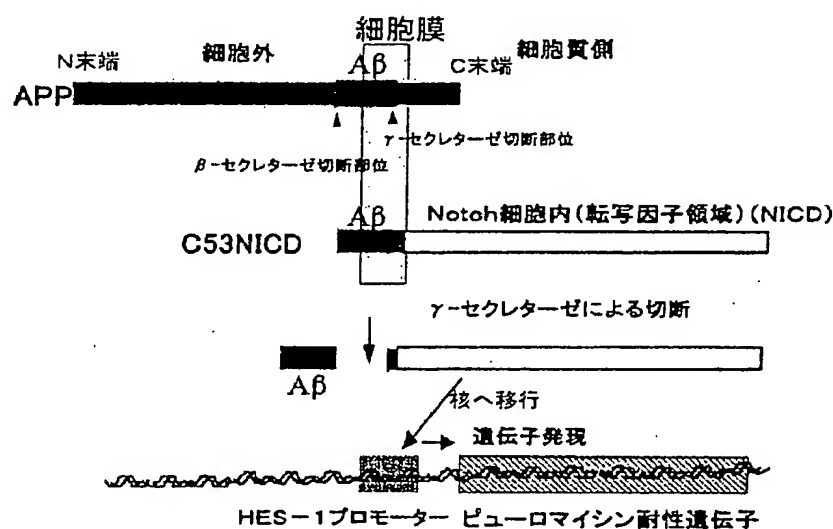
32

【図面の簡単な説明】

【図1】 γ -セクレターゼによってC53NICDキメラ蛋白

から遊離したNotch転写因子領域によるピューロマイシン耐性遺伝子の発現を調べる概略図を示す。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷

識別記号

F I

テーマコード(参考)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 25/28

4 C 0 8 4

A 6 1 P 25/28

43/00

1 1 1

4 C 0 8 5

43/00

1 1 1

C 0 7 K 14/47

4 C 0 8 6

C 0 7 K 14/47

16/18

4 H 0 4 5

16/18

19/00

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/15

1/19

C 1 2 N 1/15

1/21

C 1 2 N 1/15

1/21

C 1 2 N 1/15

1/21

C 1 2 N 1/15

1/21

C 1 2 P 21/02

C 1 2 P 21/02

C

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/02

Z

1/68

1/68

Z

G 0 1 N 33/15

C 1 2 N 15/00

Z N A A

33/50

5/00

A

(72) 発明者 駒野 宏人
愛知県刈谷市山池町 4 丁目 612 番地

F ターム (参考) 2G045 AA25 AA40 BA13 BB03 BB20
CB01 CB21 DA12 DA13 DA14
DA36 DA77 FB02 FB03 FB04
FB07
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA07
DA02 DA05 DA06 DA11 DA12
EA02 EA04 FA02 FA10 GA11
HA12
4B063 QA19 QA20 QQ08 QQ13 QQ43
QR08 QR42 QR56 QS25 QS34
QX02
4B064 AG01 CA02 CA05 CA06 CA10
CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X
AA93Y AB01 BA02 CA24
CA44 CA46
4C084 AA13 AA17 NA14 ZA161
ZA162 ZC022
4C085 AA13 AA14 BB11 EE01
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01
MA04 NA14 ZA16 ZC02
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA40 DA75 EA21 EA50 FA72
FA74